ORSAY - SERIE A,
N° D'ORDRE : 128

THÈSES

PRESENTEES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Dominique PANTALONI

PREMIERE THESE

Structure et changements de conformations de la β-lactoglobuline en solution

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 2 Décembre 1965 devant la Commission d'Examen

MM. J. TONNELAT		Président
J. MONOD	}	Examinateurs
Mlle S. GUINAND	}	Examinateurs
M. R. WURMSER		Invité

ORSAY - SERIE A,
Nº D'ORDRE : 128

THÈSES

PRESENTEES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Dominique PANTALONI

PREMIERE THESE

Structure et changements de conformations de la β-lactoglobuline en solution

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 2 Décembre 1965 devant la Commission d'Examen

MM. J. TONNELAT		Président
J. MONOD	}	Examinateurs
Mlle S. GUINAND	}	Examinateurs
M. R. WURMSER		Invité

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

PROFESSEURS

Doyens.... M. ZAMANSKY
M. BERGERARD

MM.	BRELOT	T Analyse supérieure
	PRENANT	T Anatomie et histologie comparée
	GRASSE	T Evolution des êtres organisés
	PREVOST	T Chimie organique
	WYART	T Minéralo & cristallo
	TEISSIER	T Zoologie
	MANGENOT	T Biologie végé. (Orsay)
	AUGER	T Physique quantique et relativité
	MONNIER	T Physiologie générale
	PIVETEAU	T Paléontologie
	ROCARD	T Physique ENS
	CARTAN	T Mathématiques ENS
	LAFFITTE	T Chimie générale
	N...	T Géométrie supérieure
	COULOMB	T Physique du globe
Mlle	COUSIN	T Biologie animale SPCN
	CHRETIEN	T Chimie minérale
	BOCQUET	T Zoologie
	KASTLER	T Physique ENS
	EPHRUSSI	T Génétique
	RIVIERE	T Géologie SPCN & sédiment (Orsay)
	GAUTHERET	T Biologie végétale PCB
	LUCAS R.	T Recherches physiques
	THOMAS A.	T Biologie cellulaire
	ARNULF	T Optique appliquée
	MORAND	T Physique enseignement
	SOLEILLET	T Physique PCB
	FORTIER	T Mécanique exp. des fluides
	DRACH	T Zoologie
	QUENEY	T Météo. & dynamique atmos.
	GALLIEN	T Embryologie
	EICHORN	T Botanique
	DE CUGNAC	T Biologie végétale SPCN
Mlle	CAUCHOIS	T Chimie physique
	THELLIER	T Physique du globe
	L'HERITIER	T Biologie générale Orsay
	GRIVET	T Radioélectricité Orsay
	PONCIN	T Mécanique générale
	DU BREIL	T Arith. & théorie des nombres
	QUELET	T Chimie organique
	CAGNIARD	T Géophysique appliquée
	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire
	CUVILLIER	T Micropaléontologie
	JUNG	T Géologie
	TRILLAT	T Microscopie et diffracélec.
	WIEMANN	T Chimie organ. & structu.
	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay)
	VASSY	T Physique de l'atmosphère
	DESTOUCHES	T Théorie physique
	AMIEL	T Chimie générale
	HOCART	T Minérall. & cristal.
	J.P. MATHIEU	T Physique optique
	COUTEAUX	T Cytologie
	MAY	T Zoologie
	CHOQUET	T Théorie des fonctions et topologie
	FELDMANN	T Biologie végétale marine
	GUINIER	T Physique des solides (Orsay)
	JOST	T Physiologie comparée
	FORTET	T Calcul des probabilités et physique mathématiques
	SCHWARTZ	T Calcul dif. & Intégral.
	CHOUARD	T Physiologie végétale
	MALAVARD	T Aviation (technique aéron.)
	NORMANT	T Synthèse organique
	BENARD	T Chimié minérale
	BUVAT	T Botanique ENS
	DUGUE	T Statistique mathématiques
	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
	ULRICH	T Physiologie végé. appli.
	MARECHAL	T Optique théo. & appli.
	KIRRMANN	T Théories chimiques
	CHADEFAUD	T Botanique
Mlle	LE BRETON	T Physio. de la nutrition
	LELONG	T Appli. de l'ana. à la géom.
	DEVILLERS	T Anatomie & histo. compa.
	EHRESMANN	T Topologie algébrique
MM.	FRANCON	T Physique SPCN
	GLANGEAUD	T Géogra. phys. & géol.
	DODEMENT	T Mathématiques MGP
	PISOT	T Technique math. de la physi.
	ROCH	T Géologie
	SCHATZMANN	T Astrophysique
	TERMIER	T Géologie générale
	ZAMANSKY	T Mathématiques générales
	LENNUIER	T Physique MGP
	RIZET	T Génétique Orsay
	ROUTHIER	T Géologie appliquée
Mme	TONNELAT	T Physique théorique
	DIXMIER	T Mathématiques MPC
	SOUCHAY	T Chimie générale
	AIGRAIN	T Electrotechn. géné.
	BRUSSET	T Chimie systématique
	LEVY M.	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme	CHAIX	T Chimie biologique
Mme	HUREL PY	T Biologie végétale PCB
	PANNETIER	T Chimie générale
	BRUN	T Mécanique des fluides I
	LEDERER	T Chimie biologiaue (Orsay)
Mme	DUBREIL	T Mathématiques (agréga.)
Mme	LELONG	T Math. II ENS
	BELLAIR	T Géologie SPCN
	COTTE	T Physique électricité
	DUBOIS J.E.	T Chimie organique
	LAMOTTE	T Zoologie ENS
	MICHEL A.	T Chimie minérale Orsay
	OLMER	T Energétique générale
	ROUAULT	T Electricité (Orsay)
	GAUTHIER	T Mécanique appliquée
	BARCHEWITZ	T Chimie physique
	BROSSEL	T Physique atomique
	BUSER	T Physiologie comparée
	CAMUS	T Physio. végé.
	CASTAING	T Physique II thermo. (Orsay)
	CURIEN	T Minéralo & cristal.
	MOYSE	T Physio. végé. (Orsay)
Mme	CHARNIAUX-COTTON	T Evolution des êtres organisés
	POSSOMPES	T Zoologie
	PULLMANN	T Chimie quantique
	TEILLAC	T Physique nuc. et radioactivité (Orsay)
	TONNELAT	T Bio. physico. chim. (Orsay)
	VILLE	T Econométrie
	WILLEMART	T Chimie PCB
	DODE	T Chimie (Orsay)
	FREYMANN	T Recherches physiques
	GUINOCHET	T Biolo. végé. SPNC (Orsay)
	ROLLET	T Chimie minérale
Mlle	JOSIEN	T Chimie SPCN
	CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes
	ARNOULT	T Electronique Orsay
	CHAPELLE	T Physique I (Orsay)
	DELANGE	T Mathématiques I (Orsay)
	DENY	T Mathé. géné. (Orsay)
	GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides
	LUCAS	T Géologie
	ALLARD	T Chimie physique
	BERTHELOT	T Physique des particules fondamentales (Orsay)
	BRICARD	T Météor. et physique de l'at.
Mme	ALBE	T Psycho. physio.
	FESSARD	
	FRIEDEL	T Physique des solides (Orsay)
	JULIA M.	T Etudes des moléculaires complexes
	LENDER	T Biologie animale SPCN Orsay
	MAGAT	T Physico chimie des radio éléments
Mlle	QUINTIN	T Electrochimie
	MONOD	T Chimie du métabolisme
	BENOIT	T Physio. animale Orsay
	DE POSSEL	T Analyse numérique
	CHARLOT	T Chimie analytique
	LEMEE	T Ecologie végétale Orsay

MM.	GUERIN	T Chimie MPC Orsay
	CHATELET	T Chimie PCB
	JEAN	T Physio nucléaire Orsay
	MATTLER	T Physique SPCN
	BERGERARD	T Zoologie Orsay
	BERTEIN	T Electronique Orsay
	BOUISSIERES	T Radiochimie
Mme	COUTURE	T Thermo et méca. physique
	ELLEMBERGER	T Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
	FRANC	T Biologie animal PCB
	SCHNELL	Botanique tropicale
	STLKOWSKI	T Physiologie végétale
	ACHER	T Chimie biologiques
	BAUDOIN	T Biologie animal PCB
	BEAUMONT	Biologie animal SPCN
	BLAMONT	Géophysique ionosphère
	BOUREAU	T Botanique
	CURIE D.	Physique MGP
	DURAND	T Géologie
	DELGA	
	FREON	T Chimie organique Orsay
	HELLER	T Physiologie végétale
	TORTRAT	T Calcul des probabilités
	CAILLEUX	T Géologie SPCN
	MAGNAN	Physique électricité
	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appli. à la chimie théo. & à la phy. nucléaire
Mlle	FOURCROY	Biologie végétale SPCN
Mme	CHOQUET	Mécanique analytique et méca. céleste
	BRUHAT	
Mlle	VEIL	T Physiologie générale
	LWOFF	T Microbiologie
	SIESTRUNCK	T Méca. phys. & expérimentale
	LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
	BROCHARD	T Physique PCB (Orsay)
	CABANNES	T Mécanique générale
	LESIEUR	T Math. I (Orsay)
	MAZET	T Méca. géné. (Orsay)
	CAIRE	Géogra. physique et géo. dynami.
	COMOLET	Méca. des fluides
	CORABOEUF	T Physio. animale (Orsay)
	DELLOUE	T Physique de l'exosphère
	GORENFLOT	Botanique II (Orsay)
	HOUILLON	Biologie animale PCB
	JULLIEN J.	Chimie SPCN (Orsay)
	MALGRANGE	T Technique mathé. de la phys. (Orsay)
	OLIVIER	Antropologie
	NOZERAN	T Botanique II (Orsay)
	BLANC-LAPIERRE	T Physique ENS (Orsay)
	CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay)
	KAHANE	T Mathématiques (Orsay)
	SAMUEL	T Math. ENS féminines
	KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay)
	THIRY	T Méca. céleste
	ABELES	Physique SPCN
	AMAT	T Physique PCB
	AUBOIN	T Géologie
Mme	BENOIT-GUEUTAL	T Physique nucléaire et radio-activité (Orsay)
	BOUGIS	Biologie marine Villefranche/Mer
	BRUHAT	T Math. MPC
	BRUNN	T Géologie historique Orsay
	CHABBAL	T Physique MGP (Orsay)
	DEHEUVELS	T Math. propé.
	D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay)
	FURON	T Géologie SPCN
Mme	GANS	T Génétique
	GENEVES	Biologie végétale PCB
	GUILBERT	Physique CUS Orléans
	HUPE	T Pétrographie
	HOLLANDE	T Biolo. géné.
	LIONS	T Analyse numérique
	MAITTE	T Chimie PCB
	MEYER	Physique propé.
	NICOLAS	Géologie appliquée
	PANIGEL	Biologie générale
	RAVIER	Pétrographie
MM.	ROSEAU	T Méca. théorique des fluides
	ROUBINE	Electronique
	SILBER	T Chimie PCB
	UEBERSFELD	T Electronique
	YVON	T Théories physiques
	HERVE	T Mathématiques
	NERON	T Math. MPC (Orsay)
Mme	PECKER	T Astrophysique
	WIMEL	
	BALKANSKY	Physique MPC
	LE CORRE	T Electricité
	DELCROIX	T Physique théorique (Orsay)
	GOURDIN	Physique théorique (Orsay) des hautes énergies
	LEHMANN	T Phys. exp. des hautes énergie
	NATAF	T Physique nucléaire et radio-activité (Orsay)
	ECHALIER	Biologie animale PCB
	BARRAUD	Physiolo. cellulaire
	LIORET	Physiologie végé. Orsay
	DARS	Géologie structurale & géolo. appli.
	CAMEFORT	T Botanique (agrégation)
	VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle
	BLAQUIERE	Electronique (Orsay)
	ARNOUS	T Physique théorique
	TATIBOUET	Chimie (CSU Orléans)
	MALLIAVIN	T Math. Propé. (Orsay)
	GAUDEMAR	Chimie propé.
	PEREZ Y JORBA	Physique exp. des hautes énergies (Orsay)
	DAVID	T Chimie (agrégation Orsay)
	BROUSSE	T Mécanique théorique
	ROSCH	T Astronomie
	GUY	T Physique expérimentale
	LAZARD	Math. MPC
	MOREL P.	Physique MPC
	ARSAC	Programmation
	LEFEBVRE	Chimie MPC
	CHAPEVILLE	Biochimie
	BENOIT	Physique CPEM
	RIO	Chimie CPEM
	JAUZEIN	Géologie ENS
	PREVOST G.	BV CPEM
	FAVARD P.	BA CPEM
	VILKAS	Chimie CPEM
Mlle	FICINI	Chimie CPEM
	LEQUEUX	Astronomie
	COHEN	Physique MPC
	TANNOUDJI	
	TAVERNIER	Physique PEM
Mme	ROIZEN	Physique PEM
	DURAND M.	BA SPCN
	PASCAUD	Physiologie
Mme	PETIT	BA CPEN
	BROUSSE	Géologie Orsay
	CAGNIAC	Physique agrégation Orsay
	LEBERRE	Zoologie (Orsay)
	SCHEFFER	Microbiologie (Orsay)
	de GENNES	Physique des solides (Orsay
	RIOU	Physique nucléa. exp. Orsay
	CLAUSER	Chimie biolo. Orsay
	CHEVALIER	Physio. animale Orsay
	JANCOVICI	Physique atomique Orsay
	FALK-VAIRANT	Physique nucléaire Orsay
	FETIZON	Chimie propé. Orsay
	CERF	Mathématiques Orsay
	LURCAT	Physique
	RIGAUDY	Chimie SPCN
	SIGWALT	Chimie SPCN
	FOURNET	Electricité générale
	COLLONGUES	Chimie CPEN
	DUBERT	Biochimie
	LAVOREL	Biologie physico chimique
	MOREL F.	Physiologie comparée
	TALBOT	Génétique chimique
Mme	NOUGAREDE	Botanique
	FRANCOIS	Zoologie
	IVANOFF	Océanographie physique
	CADIOT	Chimie organique
	BARUCH	Physique propédeutique
	NOZIERES	Physique générale
	BOK	Physique propédeutique
	SLONIMSKI	Génétique

Secrétaire général... R. POULAIN

A MES PARENTS

témoignage de ma reconnaissance

A MA FEMME ET A MON FILS

témoignage de mon affection

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534905_0015

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biologie Physico-chimique de la Faculté des Sciences de Paris (section Orsay), en tant qu'Attaché de recherches au CNRS.

Je suis heureux de trouver ici l'occasion d'exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Jacques Tonnelat pour m'avoir confié ce sujet et m'avoir guidé avec sollicitude tout en me laissant une grande liberté d'initiative. C'est, à son enseignement d'une grande rigueur scientifique, à ses conseils éclairés et à ses critiques judicieuses que je dois ma formation de chercheur. Qu'il me permette de lui exprimer mon respectueux attachement.

J'exprime, à Mademoiselle Sylvanie Guinand, Maître de Recherches au CNRS, qui a dirigé ce travail, ma profonde gratitude pour les précieux conseils et les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer et pour l'intérêt constant qu'elle a apporté à la réalisation et à la rédaction de ce travail.

Je prie Monsieur le Professeur Jacques Monod, Prix Nobel, de bien vouloir agréer l'expression de ma vive reconnaissance pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie de mon Jury de Thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur René Wurmser pour l'intérêt qu'il a toujours apporté à ce travail commencé dans son laboratoire.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Professeur Jeffries Wyman pour l'accueil que j'ai reçu dans son laboratoire et pour les longues et fructueuses discussions que nous avons eues ensemble. Je le prie de trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon admiration.

Notre reconnaissance va également à Monsieur Germain Mocquot, Directeur du Centre de Recherches Zootechniques de Jouy-en-Josas, qui nous a toujours généreusement fourni la matière première, indispensable à notre étude.

A Monsieur Claude Georges, Maître-Assistant, je dois de m'avoir fait partager au cours de passionnantes discussions, la grande expérience et les connaissances profondes qu'il avait des problèmes physico-chimiques. Je lui en suis très reconnaissant.

Je remercie également Monsieur Pierre Douzou, Chef de la Division de Biophysique du Service de Santé des Armées, de m'avoir permis de poursuivre une activité scientifique durant mon service militaire.

J'ai eu souvent recours à l'aide prompte et efficace de mon frère Antoine Pantaloni ; qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude.

Les mesures d'ultracentrifugation analytique ont été faites grâce à la compétence technique de Mademoiselle Andrée Barnéoud que je remercie vivement.

Je remercie enfin tous mes collègues et amis du laboratoire, il serait long de les nommer tous ici, pourtant il n'en est pas un à qui je ne doive quelque chose, un service, un conseil et, par dessus tout, la chaleur de leur amitié. Qu'ils soient assurés de ma cordiale gratitude.

Une grande partie de ce travail n'a pu être réalisée que grâce à l'appui financier attribué au laboratoire par le " Comité de Biologie Moléculaire " de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, nous lui en sommes particulièrement reconnaissant.

★

STRUCTURE ET CHANGEMENTS DE CONFORMATIONS DE LA β-LACTOGLOBULINE EN SOLUTION

SOMMAIRE

Pages

CHAPITRE I.- MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE 1

I.- Introduction 1
II.- Composition des β-lactoglobulines A, B et C 1
III.- Propriétés physicochimiques des β-lactoglobulines 3
IV.- Structure de la β-lactoglobuline 6

CHAPITRE II.- PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES 13

I.- Spectropolarimétrie 13
II.- Spectrophotométrie de différence 16
III.- Matériel utilisé 19

CHAPITRE III.- STRUCTURE DE LA β-LACTOGLOBULINE AU pHi . . . 21

I.- Dispersion rotatoire 21
1.- Données expérimentales 21
2.- Interprétation et discussion des résultats 24

II.- Spectres de différences d'absorption 28
Données expérimentales 28
Discussion 29

CHAPITRE IV.- ETUDE DES TRANSCONFORMATIONS DE LA β-LACTOGLOBULINE AU-DESSUS DU POINT ISOELECTRIQUE . 33

Introduction 33

1ère Partie : Etude théorique des changements de structures tertiaires et quaternaires associés à la fixation spécifique d'un proton . . 35

I.- Transconformation associée à une ionisation 35
II.- Dimérisation associée à une ionisation 38

Pages

III.- Transconformation et dimérisation liées à une ionisation. . . . 45

A.- Intéractions symétriques entre protomères. 45

1.- Constantes de dissociation moléculaire. 49
2.- Constantes d'ionisation. 52
3.- Constantes de transconformation 52

B.- Absence d'intéractions symétriques entre les protomères 53

IV.- Conclusions. 56

A.- Principaux résultats obtenus 56
B.- Cas particuliers. 57
C.- Généralisation. 58

2ème Partie : Etude expérimentale de la transconformation de la β-lactoglobuline 59

I.- Résultats expérimentaux et leur interprétation. 59

A.- Méthodes expérimentales. 59
B.- Etude spectropolarimétrique. 60

1.- Introduction. 60
2.- Variations des propriétés rotatoires de la β-lactoglobuline en fonction du pH 62
3.- Effet de la concentration protéique. 64
4.- Effet du chlorure de sodium (1M) 65
5.- Effet d'une élévation de température. 67

C.- Etude spectrophotométrique de la β-lactoglobuline . . . 70

1.- En fonction du pH. 70
2.- En fonction de la température 72

D.- Dissociation moléculaire réversible (rappel bibliographique). 73

II.- Discussion : applications des données théoriques 75

A.- Transconformation et dissociation moléculaire. 75
B.- Variation du degré apparent de transconformation y_t en fonction du pH. 78
C.- Transconformation réelle de la β-lactoglobuline. 80
D.- Détermination de la valeur des constantes d'équilibres intrinsèques 81
E.- Relations entre la température et les constantes apparentes d'équilibre. 83

1.- Aspect théorique du problème 83
2.- Application à la β-lactoglobuline. 86

Pages

CHAPITRE V.- TRANSCONFORMATION REVERSIBLE DE LA β-LACTOGLOBULINE ASSOCIEE A LA CHELATION D'UN ION CUIVRIQUE PAR DEUX IMIDAZOLES 89

I.- Généralités 89
II.- Etude théorique de la fixation des ions cuivre par la β-lactoglobuline 90
III.- Etude expérimentale, par différentes techniques, de la fixation de l'ion Cu^{++} 93

A.- Introduction 93
B.- Polarimétrie 94

1.- Résultats 94
2.- Discussion et interprétation des résultats 95

C.- Ultra-centrifugation analytique 95
D.- Spectrophotométrie 96
E.- Titrage électrométrique 98

1.- Résultats 98
2.- Constante de dissociation du complexe 100

IV.- Discussion générale 101

CHAPITRE VI.- ETUDE CINETIQUE DE L'ACTION DES IONS CUIVRIQUES SUR LA β-LACTOGLOBULINE AU-DESSUS DE pH 7. ROLE du GROUPE SH 105

I.- Introduction 105
II.- Techniques 105
III.- Résultats et discussions 107

A.- Introduction 107
B.- Etude cinétique de l'effet de l'ion Cu^{++} sur la β-lactoglobuline 107

1.- Ordre des réactions 109
2.- Effet de la concentration en ion Cuivre 110
3.- Effet du pH 111
4.- Réversibilité de l'effet du pH 114
5.- Effet de la température 117
6.- Effet des inhibiteurs 119
7.- Effet des ions de métaux lourds 120
8.- Rôle de l'ion cuivrique au cours de la réaction d'ordre 2 121
9.- Effet du ferricyanure de potassium 122
10.- Rôle de la structure protéique dans les phénomènes observés 123

Pages

CHAPITRE VII.- TRANSFORMATIONS IRREVERSIBLES DE LA β-LACTOGLOBULINE 125

I.- Introduction 125
II.- Transconformation irréversible R → S 126

A.- Changement de structure provoqué par les ions de métaux lourds 126

1.- Etude polarimétrique en fonction de la concentration en ions de métaux lourds 126
2.- Etude spectropolarimétrique 127
3.- Etude spectrophotométrique de différence 128
4.- Titrage électrométrique 130
5.- Variation de la masse moléculaire 132
6.- Conclusions 132

B.- Changement de structure provoqué par les ions OH^- et par action de la chaleur 133
C.- Etude thermodynamique de la transition R → S 135

1.- Introduction 135
2.- Effet de la température sur la cinétique de transition 137
3.- Effet du pH 139
4.- Effet de la force ionique 139
5.- Effet du ferricyanure de potassium 140

III.- Agrégation thermique de la β-lactoglobuline 142

A.- Etude cinétique de l'agrégation thermique 142
B.- Action de la température sur la cinétique d'agrégation . 145
C.- Rôle des groupes SH dans le phénomène d'agrégation . 149
D.- Effet de la force ionique et du pH sur la vitesse d'agrégation 151
E.- Spécificité de l'agrégation thermique des β-lactoglobulines A et B 151

IV.- Conclusion 153

CONCLUSIONS GENERALES 157

Références Bibliographiques.

CHAPITRE I

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

I.- INTRODUCTION

La β-lactoglobuline est la protéine la plus abondante du lactosérum (environ 1 g par litre), elle a été isolée à partir du lait de vache pour la première fois par Palmer en 1934. Bien que l'on ne lui connaisse pas d'activité biologique, cette molécule est l'objet d'études de plus en plus nombreuses chaque année car c'est une protéine globulaire typique. On l'obtient aisément et en grande quantité à un degré de pureté élevé sous forme de très beaux cristaux rhomboèdriques; de plus elle est stable en solution aqueuse dans une large zone de pH et de température; toutes ces propriétés favorables font de la β-lactoglobuline un matériel de choix pour l'étude des propriétés physicochimiques générales des protéines.

En 1946, Li démontra que la β-lactoglobuline n'était pas homogène électrophorétiquement et mit en évidence 2 constituants de mobilités différentes. Des essais de séparation de ces constituants furent entrepris par Polis *et al.* (1950); puis Aschaffenburg *et al.* (1955), analysant le lait de différentes vaches, montrèrent que l'on pouvait obtenir, suivant les animaux, soit l'un soit l'autre des constituants, soit un mélange des deux. On appela β-lactoglobuline A la protéine ayant la plus grande vitesse de migration électrophorétique, β-lactoglobuline B la protéine la plus lente et β-lactoglobuline AB le mélange naturel des deux. Récemment une troisième β-lactoglobuline a été découverte par Bell (1962) : la β-lactoglobuline C, dont la vitesse de migration électrophorétique est légèrement supérieure à celle de la β-lactoglobuline B.

La propriété de sécréter l'une ou l'autre des β-lactoglobulines A, B ou C est, pour les bovidés, un caractère héréditaire. Nous aborderons le problème génétique un peu plus loin.

II.- COMPOSITION DES β-LACTOGLOBULINES A, B et C

La masse moléculaire de la β-lactoglobuline (*), déterminée par différentes méthodes physiques, est de l'ordre de 35000, au voisinage de son point isoélectrique. Sur la base de cette masse moléculaire, l'analyse chromatographique de l'hydrolysat total de la protéine a permis à Brand *et al* (1945) puis à Stein et Moore (1949) d'obtenir la composition en amino-acides de la β-lactoglobuline. Piez *et al* (1961) et Gordon *et al* (1961) ont établi de façon plus précise la composition en amino-acides des β-lactoglobulines A et B et récemment de la β-lactoglobuline C (54). Nous présentons dans le tableau I le résultat de ce travail fondamental pour l'étude des β-lactoglobulines.

La composition en acides aminés des β-lactoglobulines A, B et C permet de comprendre l'origine des différences de migration électrophorétique entre ces trois iso-protéines et de calculer leurs masses moléculaires qui serait de 36 300, 36 200 et 36 200 pour les β-lactoglobulines A, B et C respectivement. Cependant, on peut remarquer que tous les acides aminés sont en nombres pairs et que ces nombres admettent 2 comme PGCD. D'autre part, Fraenkel-Conrat (1954) a montré que la β-lactoglobuline possédait deux extrémités C terminales et N terminales identiques, et a donné en 1955 la composition du tripeptide N terminal, et Kalan (1961) a donné celle du décapeptide C terminal :

- N terminal : leu-leu-val-...
- C terminal : ileu-his-leu-(gluN, sér, thr, ala, val, lys, arg)

TABLEAU I

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES β-LACTOGLOBULINES A, B et C

	A	B	C
Acide aspartique	32	30	30
Acide glutamique	50	50	48
Alanine	28	30	30
Glycocolle	6	8	8
Histidine	4	4	6
Valine	20	18	18
Arginine	6		
Cystéine	10	*la composition*	
Isoleucine	20	*pour les autres*	
Leucine	44	*acides aminés*	
Lysine	30	*est identique*	
Méthionine	8	*dans les β-lactoglobulines*	
Phénylalanine	8	*A, B et C.*	
Proline	16		
Sérine	14		
Thréonine	16		
Tryptophane	4		
Tyrosine	8		
Nombre total d'amino-acides	324	324	324
Masse molaire calculée	36 300	36 200	36 200

(d'après Piez *et al* (1961), Gordon *et al* (1961) et Kalan *et al* (1964).

Ces résultats prouvent que la β-lactoglobuline est formée de deux chaînes probablement identiques, ce qui semble confirmé par le fait que, dans certaines conditions physicochimiques, la masse moléculaire de la β-lactoglobuline est voisine de 18 000.

(*) *Nous écrirons β-lactoglobuline sans préciser A, B ou C, lorsqu'il s'agira de propriétés communes à ces protéines ou de travaux effectués sur des mélanges naturels de ces protéines.*

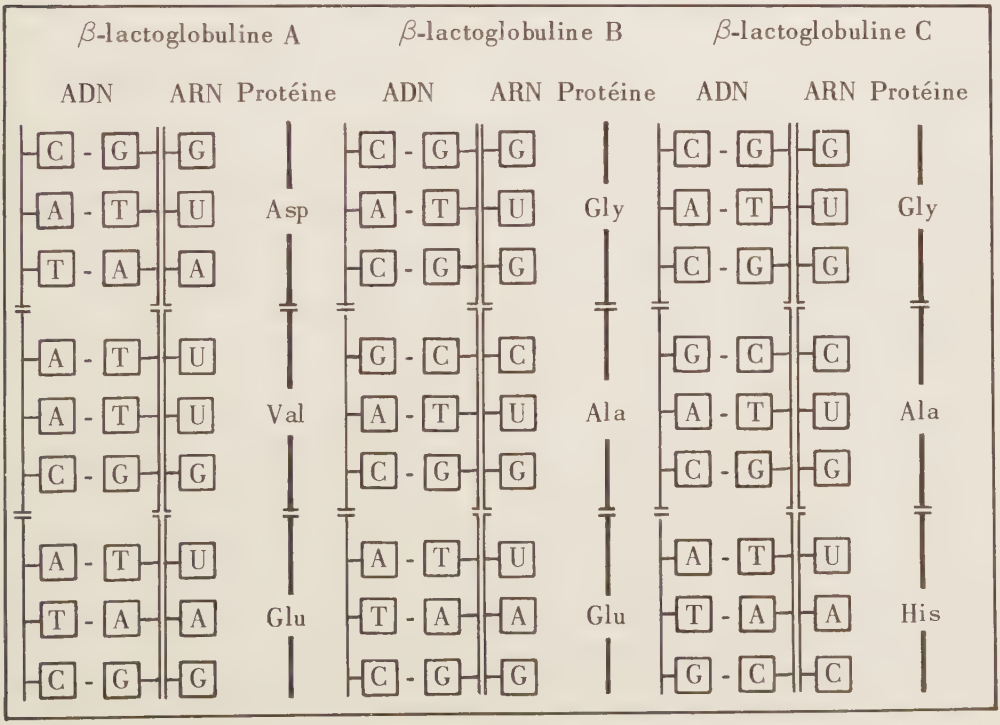
En ne considérant qu'une chaîne de β-lactoglobuline, on voit d'après le tableau I, que la β-lactoglobuline C diffère de la β-lactoglobuline B par substitution d'un résidu histidine à un résidu acide glutamique, la β-lactoglobuline A diffère de la β-lactoglobuline B par la double substitution des résidus acide aspartique et valine aux résidus glycocolle et alanine ou bien alanine et glycocolle. Il y avait donc dans ce dernier cas une alternative qui a été levée par Kalan *et al* (1962) ; ces auteurs ont mis en évidence la substitution du résidu asp. par un résidu gly. dans deux peptides homologues isolés de la β-lactoglobuline A et de la β-lactoglobuline B après digestion chymotrypsique de ces protéines.

Nous pouvons donc résumer les différences entre les β-lactoglobulines A, B et C comme suit :

A		B		C
asp	⟷	gly		gly
val	⟷	ala		ala
glu		glu	⟷	his

Ce résultat pose naturellement le problème de l'origine de ces différences. Ce problème est essentiellement génétique ; il a été établi en effet pour les lactoglobulines A et B que les supports héréditaires déterminant les caractères asp-val et gly-ala se comportent comme des allèles d'un facteur mendelien simple sans dominance : les individus hétérozygotes possèdent les deux types de protéines en quantités équivalentes (68). L'absence de ségrégation entre les caractères asp et val et entre gly et ala suggère que, dans les acides nucléiques support de l'information génétique, les séquences des triplets, codant ces amino-acides particuliers, doivent être relativement proches l'une de l'autre.

TABLEAU II



La β-lactoglobuline C qui diffère de la β-lactoglobuline B par la substitution glu-his peut être considérée comme dérivant de la β-lactoglobuline B par une seule mutation.

Nous avons représenté dans le tableau II les amino-acides différents qui occupent des positions homologues sur la chaîne polypeptidique des β-lactoglobulines A, B et C et en face de chacun de ceux-ci le triplet de bases de l'ARN et de l'ADN qui forme le codon déterminant la nature de l'amino-acide, selon Nurenberg *et al* (1962) et Ochoa *et al* (1962).

Il est très satisfaisant de remarquer que chacune des trois substitutions n'implique le changement que d'une seule base sur trois, la validité du code génétique nous aurait paru suspecte s'il avait été nécessaire que deux évènements très peu probables se produisent au niveau du même triplet pour expliquer une substitution d'amino-acide. Il semble donc que l'on puisse dire que les substitutions d'amino-acides dans la β-lactoglobuline apportent une preuve supplémentaire en faveur de l'universalité du code génétique établi sur les bactéries.

III.- PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE LA β-LACTOGLOBULINE

La β-lactoglobuline possède les caractères de solubilités propres aux protéines globulaires appartenant à la classe des globulines : elle est très peu soluble dans l'eau, mais présente une augmentation de solubilité (salting in) importante lorsque l'on fait croitre la concentration saline à pH constant (67) (125) ; elle passe par exemple de 1,2 mg/ml pour 10^{-3} M de NaCl à 12,5 mg/ml pour 2.10^{-2} M de NaCl à pH 5,2. Cette propriété est certainement en rapport avec la composition en acides aminés et le caractère de polyélectrolyte amphotère de la protéine.

La dissociation des ions hydrogènes de la β-lactoglobuline a été étudiée de façon complète par Cannan *et al* (1942) et par Nozaki *et al* (1959). Ces auteurs obtiennent des résultats comparables dans la zone de pH où le titrage est réversible. Dans la région alcaline la β-lactoglobuline se dénature au cours du temps avec une cinétique de réaction d'ordre 1 (16), Nozaki a pu cependant obtenir aux pH alcalins deux courbes de titrage : une par extrapolation des mesures au temps zéro de la réaction de dénaturation alcaline et l'autre à partir des mesures faites au bout d'un temps " infini ". Ces deux courbes correspondent respectivement à la β-lactoglobuline native et à la β-lactoglobuline dénaturée. La différence entre ces deux courbes révèle une augmentation du nombre de groupes titrables et une diminution du coefficient d'intéraction électrostatique, w, de Linderstrom-Lang. Les résultats sont groupés dans le tableau III.

Nous remarquerons qu'avec la β-lactoglobuline native on titre apparemment 2 imidazoles de plus et 2 carboxyles de moins que ne l'indique l'analyse chimique, tandis qu'après dénaturation alcaline le nombre de groupes titrés est en accord avec cette analyse chimique. Il est donc évident que dans la protéine native 2 carboxyles s'ionisent dans la même zone de pH que les imidazoles. Ce fait surprenant a été confirmé par spectroscopie IR différentielle (Susi *et al* (1959). Tanford *et al* (1961) et Pantaloni (1961) ont montré qu'il existait un carboxyle anormal par chaîne de β-lactoglobuline et que l'ionisation de ce groupe était liée à un changement réversible de la structure de la molécule, observable par spectropolarimétrie. L'ionisation de ce carboxyle anormal est également associée à une modification du spectre d'absorption d'un résidu tyrosine, nous l'avons mis en évidence par spectroscopie UV de différence (Pantaloni (1963)).

TABLEAU III

TITRAGE ELECTROMETRIQUE DES β-LACTOGLOBULINES
A et B (masse molaire = 36 000)

	Analyse chimique		Titrage électrométrique			
	A	B	A	B	(AB) native	(AB) dénaturée
COOH terminal	2	2	52	50	51	53
COOH latéral	52	50				
Imidazole	4	4	6	6	6	4
NH_2 terminal	2	2	2	2	2	2
Thiol	2	2			0	2
Phénol	8	8			34	6
NH_2 latéral	28	28				28
Guanidyl	6	6				
NH^+	40	40	40	40	40	40

(d'après Nozaki (1959)).

Nous remarquerons également que les thiols ne sont pas titrés dans la β-lactoglobuline native, ce qui est prouvé par l'absence de réaction avec la N-éthylmaléimide, la porphyridine et le test au nitroprussiate (Brand *et al*, 1942).

L'étude détaillée des courbes de titrage fournit des indications sur la forme de la molécule. Ainsi la valeur du facteur d'interaction électrostatique, w, dans la région de titrage des carboxyles est égale à 0,072 et 0,039 pour les forces ioniques 0,01 et 0,15 ; ces valeurs sont proches de celles que l'on pouvait s'attendre à trouver pour une protéine globulaire compacte.

Cannan *et al* ont montré que le rapport de la charge nette à la mobilité électrophorétique de la β-lactoglobuline est pratiquement constant entre pH 4 et 9 ; la valeur de ce rapport est peu supérieure à celle donnée par la théorie de Debye-Huckel-Henry pour la mobilité des ions sphériques.

Nous pouvons donc en première approximation considérer la β-lactoglobuline comme une sphère rigide avec des charges uniformément réparties à sa surface.

Par contre après dénaturation alcaline la protéine se comporte comme un polyélectrolyte flexible ; le coefficient d'interaction électrostatique est faible, ce qui s'explique si l'augmentation de la charge est compensée par une augmentation de la distance moyenne qui sépare ces charges, si bien que les forces agissant sur le proton demeurent virtuellement inchangées.

IV.- STRUCTURE DE LA β-LACTOGLOBULINE

Il est classique et commode de distinguer dans les protéines quatre niveaux d'organisation structurale.

a.- *LA STRUCTURE PRIMAIRE,* comprend le nombre, la composition et la séquence des résidus d'amino-acides dans la chaîne polypeptidique.

b.- *LA STRUCTURE SECONDAIRE,* est l'arrangement régulier et périodique du squelette polypeptidique de la protéine : elle est généralement formée par une disposition des résidus d'amino-acides en hélice α ou structure β.

c.- *LA STRUCTURE TERTIAIRE,* est formée par les repliements, ni réguliers ni symétriques, de la molécule. Cette conformation à laquelle les protéines globulaires doivent leurs particularités structurales est sans doute la moins bien connue.

d.- *LA STRUCTURE QUATERNAIRE* est la manière dont les molécules protéiques sont associées entre elles pour former un dimère, un tétramère,... un oligomère de structure parfaitement définie.

1.- STRUCTURE PRIMAIRE DE LA β-LACTOGLOBULINE

On ne connait à l'heure actuelle de la structure primaire de la β-lactoglobuline, que la composition globale des 162 amino-acides qui constituent la chaîne polypeptidique, les tripeptides de chaque extrémité terminale (voir page 2) et l'existence des substitutions d'acides aminés qui permettent de distinguer les β-lactoglobulines A, B et C (voir page 3).

2.- STRUCTURE SECONDAIRE DE LA β-LACTOGLOBULINE

Les principales techniques capables de nous apporter des renseignements sur la structure interne des protéines ont été employées pour étudier la structure secondaire de la β-lactoglobuline. Ce sont surtout des techniques qui utilisent les interactions du rayonnement électromagnétique avec la matière :

Diffraction des RX par les cristaux de protéine..
Diffusion des RX aux petits angles (en solution aqueuse).
Spectroscopie UV.
Spectroscopie IR.
Spectropolarimétrie.

L'étude aux rayons X pour déterminer la structure tridimensionnelle de la β-lactoglobuline a été entreprise par Green *et al* (1963) mais nous ne devons pas encore en attendre de résultats importants dans l'immédiat.

La spectroscopie ultra-violette permet l'étude du spectre d'absorption de la protéine au voisinage de 190 mμ au niveau de la liaison peptidique. L'hypochromisme de cette bande d'absorption semble être en étroite corrélation avec la conformation en hélice α. Rosenheck et Doty (1961) attribuent à la β-lactoglobuline à partir de la mesure de cet hypochromisme :

30 % de structure en hélice à pH 6,4
et 16 % de " " à pH 8,7

La spectroscopie infra-rouge est difficilement utilisable avec un solvant tel que l'eau dans la zone d'absorption de la liaison hydrogène. Cependant, l'eau lourde permet d'observer cette zone d'absorption et de suivre cinétiquement l'échange des ions hydrogènes de la protéine par des ions deutérium. Cette technique est utilisée pour évaluer le nombre d'ions hydrogènes interamides qui sont difficilement échangeables et par conséquent de connaître le taux d'hélice α de la protéine. Linderstrom-Lang (1958) et Blout *et al* (1961) trouvent que la β-lactoglobuline (36 000) qui contient 324 résidus d'amino-acides échange 450 hydrogènes rapidement et 100 autres après dénaturation. Seuls ces 100 protons sont attribués à la liaison interamide; donc sur 324 résidus 100 d'entre eux pourraient être incorporés dans une structure en hélice α, soit environ 30 %.

La spectropolarimétrie comme nous le verrons plus loin est sans doute une des meilleures méthodes pour l'étude qualitative et semi-quantitative de la structure secondaire des protéines. Cependant l'analyse des résultats peut être difficile si la protéine étudiée possède plus de deux types de structures dans la molécule, comme cela semble être le cas pour la β-lactoglobuline. Et en fait le taux d'hélice α estimé pour cette protéine varie dans de larges proportions suivant les auteurs et les paramètres rotatoires choisis.

3.- STRUCTURE TERTIAIRE DE LA β-LACTOGLOBULINE

La chaîne polypeptidique de la β-lactoglobuline est formée de 162 résidus d'amino-acides, la longueur de la chaîne étirée est donc de 600 Å environ pour un diamètre de l'ordre de 10 Å (l'encombrement moyen d'une chaîne latérale étant de 5,4 Å). Or nous avons vu par titrage électrométrique que la β-lactoglobuline se comporte comme une sphère chargée indéformable, les méthodes hydrodynamiques (viscosité, sédimentation, diffusion) donnent de même des résultats en accord avec une forme globulaire compacte de 27 à 29 Å de rayon (Bunville (1959)). Ces résultats sont également compatibles avec une forme éllipsoïde dont le rapport axial serait de 3 : 1. La chaîne polypeptidique est donc nécessairement repliée sur elle-même. Cette structure tertiaire doit être stabilisée par des forces coulombiennes, des liaisons hydrogènes, des forces de Van der Waals ou des forces dérivant d'interactions entre chaînes hydrocarbonnées hydrophobes mais aussi par des liaisons disulfures; en effet la β-lactoglobuline contient deux ponts disulfures et un groupe SH par chaîne.

Ces ponts S - S, par leur position, déterminent une certaine conformation de la chaîne peptidique. Ne connaissant pas la structure primaire de la protéine, nous ne pouvons faire qu'une étude théorique de la structure tertiaire la plus probable de la protéine.

Si nous supposons que les résidus cystéines sont approximativement également espacés le long de la chaîne peptidique, il s'en suit que l'arrangement le plus probable des ponts disulfures doit être celui dans lequel les cystéines voisines sont liées l'une à l'autre, car cet arrangement est celui qui réduit le moins le nombre de degrés de liberté de la chaîne peptidique (Kauzmann 1959). Pour les 5 résidus cystéines de la chaîne de β-lactoglobuline il est facile d'établir qu'il y a 15 combinaisons possibles pour la position des 2 ponts SS : $5\,!\,/\,(2\,!\;2^2) = 15$.

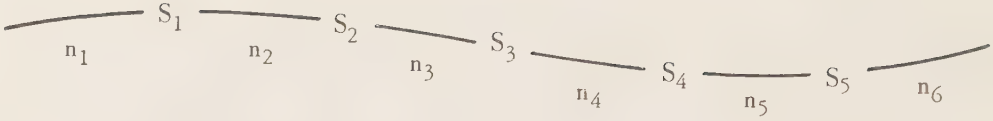
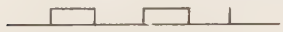
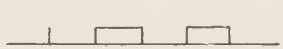
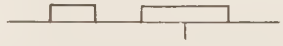
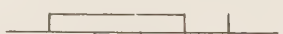
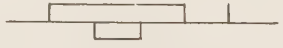


TABLEAU IV

Combinaisons des ponts S-S		Nombre de configurations	Probabilité relative
1-2, 3-4		$N/\ (n_2n_4)^{-3/2}$	1
1-2, 4-5		$N/\ (n_2n_5)^{-3/2}$	
2-3, 4-5		$N/\ (n_3n_5)^{-3/2}$	
1-3, 4-5		$N/[(n_2+n_3)n_5]^{-3/2}$	0,353
1-2, 3-5		$N/[n_2(n_4+n_5)]^{-3/2}$	
1-4, 2-3		$N/[n_3(n_2+n_4)]^{-3/2}$	
2-5, 3-4		$N/[n_4(n_3+n_5)]^{-3/2}$	
1-3, 2-4		$N/[n_2n_3+n_3n_4+n_2n_4)]^{-3/2}$	0,192
2-4, 3-5		$N/[(n_3n_4+n_4n_5+n_3n_5)]^{-3/2}$	
1-5, 2-3		$N/[n_3(n_2+n_4+n_5)]^{-3/2}$	
1-5, 3-4		$N/[n_4(n_2+n_3+n_5)]^{-3/2}$	
1-5, 2-4		$N/[n_3+n_4)(n_2+n_5)]^{-3/2}$	0,125
1-4, 3-5		$N/[(n_2+n_3)n_4+n_4n_5+(n_2+n_3)n_5]^{-3/2}$	0,090
1-3, 2-5		$N/[(n_2+n_3)+n_3(n_4+n_5)+n_2(n_4+n_5)]^{-3/2}$	
1-4, 2-5		$N/[n_2(n_3+n_4)+(n_3+n_4)n_5+n_2n_5]^{-3/2}$	

N = nombre total de configurations possibles en absence de ponts disulfures :

$$N = A^2\ C^{n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5 + n_6} = A^2\ C^{162}$$

A est une constante, n_i le nombre de liaisons flexibles et C_i^n le nombre de configurations possibles pour n_i liaisons flexibles.

D'après une communication personnelle d'Aschaffenburg le groupe SH serait en S_5 en position antépénultième à l'extrémité C terminale ; le nombre de combinaisons se trouve donc réduit à 3.

On peut en utilisant la méthode de calcul proposée par Kauzmann connaître le nombre de configurations possibles de la chaîne pour chacune de ces 15 combinaisons, les plus probables étant celles ayant le plus grand nombre de configurations possibles. Nous avons porté dans le tableau IV les résultats de ces calculs; ne connaissant pas la position des 5 résidus cystéines nous avons calculé la probabilité relative de ces différents arrangements en supposant ces résidus également espacés. Cependant, cette probabilité relative pourra être facilement corrigée lorsque nous connaîtrons la valeur de n_2, n_3, n_4, et n_5, c'est-à-dire le nombre de liaisons flexibles séparant les cystéines entre elles.

4.- STRUCTURE QUATERNAIRE

La possibilité d'association et de dissociation moléculaire semble une propriété quasi générale des protéines globulaires à laquelle n'échappent pas les β-lactoglobulines, au contraire, elles illustrent et aident à mieux comprendre ce phénomène.

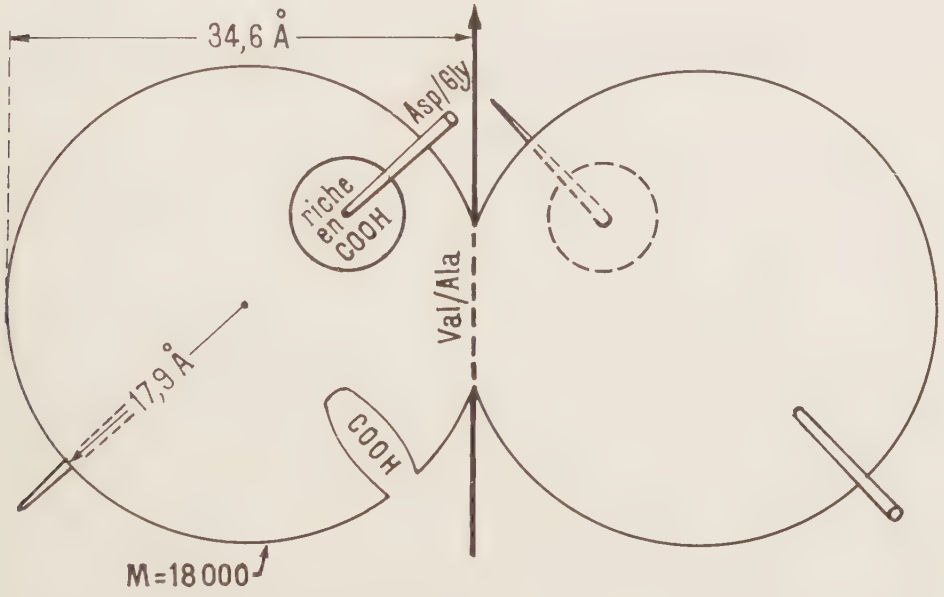


Fig. 1 - β-lactoglobuline d'après le modèle de Green-Aschaffenburg, complété par Timasheff.

La masse moléculaire de la β-lactoglobuline a été déterminée par les techniques physiques les plus diverses :

Diffraction des rayons X (Crowfoot 1941, Senti et Warner 1948)
Sédimentation-diffusion (Pedersen 1936, Cecil et Ogston 1949, Miller et Golder 1952)
Diffusion de la lumière (Halwer, Nutting et Brice 1951)
Sédimentation à l'équilibre (Townend et Timasheff 1957)
Pression osmotique (Bull et Currie 1946)

Ces différentes techniques donnent des valeurs de la masse moléculaire comprises entre 35 000 et 37 000 à l'état cristallisé ou en solution au voisinage du pH isoélectrique. Cependant dans certaines conditions de milieu on obtient une masse moléculaire moitié : par étalement de la β-lactoglobuline à la surface d'une solution de sulfate d'ammonium Bull (1946) trouve M = 17 000 ± 500, Townend et Timasheff (1957) trouvent approximativement 17 500 par diffusion de la lumière et par sédimentation en solution aqueuse au-dessous de pH 3,5, Georges et Guinand (1960) trouvent également cette valeur en solution aqueuse au-dessus de pH 8,8 à 45°C. D'autre part, nous avons vu plus haut que la masse moléculaire obtenue par les méthodes chimiques pour une seule chaîne était de 18 000.

Nous pouvons donc dire que la β-lactoglobuline en solution au voisinage du pHi et à température ordinaire *est en fait un dimère*, qui se dissocie réversiblement en monomères, pour des valeurs de pH se situant de part et d'autre du point isoélectrique c'est-à-dire lorsque la charge nette de la protéine augmente.

Au voisinage du point isoélectrique entre pH 3,5 et 5,1, lorsque l'on abaisse la température, la β-lactoglobuline A s'agrège réversiblement en formant un octomère ou plutôt un tétramère de dimère (M = 144 000). Cet équilibre de tétramérisation est rapide ; il peut être presque entièrement déplacé, à basse température, dans le sens de l'association pour la β-lactoglobuline A mais très peu pour les β-lactoglobulines B et C.

Ces équilibres de dimérisation et de tétramérisation ont été étudiés en détail par Timasheff et Townend et par Georges et Guinand en utilisant comme technique la diffusion de la lumière et l'ultracentrifugation. Ces travaux illustrent de façon excellente les théories de Gilbert sur les équilibres multiples (35).

Une image de la structure géométrique de la β-lactoglobuline nous est donnée par Green et Aschaffenburg (1959) qui ont étudié la diffraction des rayons X par les cristaux de β-lactoglobuline A et B. La β-lactoglobuline de masse moléculaire 36 000 est composée de 2 sous-unités semblables, et le modèle proposé est celui de deux sphères de 17,9 Å de rayon, légèrement écrasées au niveau de leur surface de contact ce qui donne une distance de centre à centre de 33,5 Å, cette structure possède un axe de symétrie binaire perpendiculaire au grand axe du dimère (voir schéma, figure 1). Le rayon de giration calculé à partir de cette structure est de 21,7 Å, cette valeur est précisément celle qui a été obtenue en solution (pH 5,7 à 25°C μ = 0,1) par diffusion des rayons X aux petits angles par Witz *et al* (1964), ce qui semble indiquer que le modèle de Green-Aschaffenburg est encore valable en solution. Ces mêmes auteurs (Witz *et al*), proposent pour la forme de l'octomère de β-lactoglobuline A, un empilement cubique de 8 sphères possédant un axe de symétrie quaternaire.

COMPARAISON DES β-LACTOGLOBULINES A ET B

SOLUBILITE : La β-lactoglobuline B est 4 fois plus soluble dans l'eau que la β-lactoglobuline A, (Treece *et al* 1963).

IMMUNOLOGIE : Les β-lactoglobulines A et B sont immunologiquement identiques (De Weer *et al*, 1962).

DIMERISATION : Il n'y a pas formation de dimère hybride A - B en solution après dissociation réversible en milieu acide, (Townend *et al* 1961).

TETRAMERISATION : Seule la β-lactoglobuline A forme réversiblement des octomères à partir des molécules dimères à basse température. La β-lactoglobuline B peut cependant être incorporée jusqu'à 30 % dans cet oligomère. (Timasheff *et al* 1964).

HYDROLYSE TRYPSIQUE : La β-lactoglobuline A est hydrolysée 3 fois plus vite et plus complètement que la β-lactoglobuline B à pH 6,92 (Préaux *et al* 1962).

La constante de vitesse de décomposition du complexe enzyme substrat est relativement plus grande pour la β-lactoglobuline A que pour la β-lactoglobuline B (Monnot 1963).

DENATURATION THERMIQUE : La dénaturation thermique de la β-lactoglobuline A est plus rapide que celle de la β-lactoglobuline B (Dupont 1964).

TABLEAU V

CONSTANTES PHYSIQUES DE LA β-LACTOGLOBULINE (A ET B) A 20°C ET A SON POINT ISOELECTRIQUE

Point isoélectrique	pHi	pH 5,1 - 5,3	(17)
Masse moléculaire	M	36 000	(123)
Coefficient de sédimentation	$s_{20,w}$	2,85 unités Svedberg	
Coefficient de diffusion	$D_{20,w}$	$7,34\ 10^{-7}$ cm^2/g	(82bis)
Viscosité intrinsèque	$[\eta]$	3,40 cm^3/g	(16)
Volume partiel spécifique		0,751 - 0,746 cm^3/g	(92)
Hydratation		35 - 40 %	
Rapport axial		2 : 1	(39)
Rayon de giration		21,7 Å	(130)
Moment dipolaire apparent		730 unités Debye	
Indice de réfraction	n	1,594 à 589 mμ (25°C)	(76)
Coefficient d'extinction spécifique à 278 mμ	$E_1^{1\%}_{cm}$	9,8	(94)
Constantes de dispersion rotatoire			(ce travail)
Drude λ_c	λ_c	247 mμ	"
Moffit A	A	$- 8,25\ 10^6$	"
Moffit b_o	b_o	- 56°	"
Moffit a_o	a_o	- 157°	"
Coefficient d'intéraction électrostatique	w	0,072 pour μ = 0,01 0,039 pour μ = 0,15	(73)

CHAPITRE II

PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES

I.- SPECTROPOLARIMETRIE

Comme la plupart des substances biologiques les protéines possèdent la propriété de faire tourner le plan de polarisation de la lumière. Cette propriété sert de base à une méthode permettant d'évaluer le contenu en hélice α des polypeptides de synthèses et des protéines en solution. La méthode utilisée repose sur des données théoriques et surtout sur des corrélations expérimentales établies entre les propriétés rotatoires et la structure des polypeptides de synthèses, que nous allons rappeler brièvement.

L'usage a conservé la définition que Biot a donnée du pouvoir rotatoire spécifique d'une substance optiquement active :

$$[\alpha] = \alpha / l.\ c$$

où α est la rotation observée en degré, l la longueur du parcours optique en décimètre et c la concentration de la substance active en grammes par millilitre.

Il est quelquefois préférable d'exprimer la rotation par rapport aux masses moléculaires. On définit le pouvoir rotatoire moléculaire [M] par la relation :

$$[M] = \frac{[\alpha]\ M}{100}, \qquad M \text{ est la masse moléculaire}$$

Pour les polymères on utilisera de préférence le pouvoir rotatoire par motif ou par résidu moyen :

$$[m] \text{ ou } [R] = \frac{[M]}{n} = \frac{[\alpha] \times \overline{MRm}}{100}$$

n, est le nombre de motif, $\overline{MRm}$, la " masse moléculaire " d'un résidu moyen, $\overline{MRm}$ est souvent de l'ordre de 110 pour les protéines globulaires, [R] est donc plus grand que $[\alpha]$ d'environ 10 %.

Le pouvoir rotatoire d'une substance dépend de la polarisabilité du milieu dans lequel elle se trouve. Il y a lieu d'en tenir compte quand on veut comparer des

observations faites avec des solvants d'indices de réfraction très différents. On obtient alors le pouvoir rotatoire qu'aurait la substance dans le vide :

$$[R'] = 3/(n^2 + 2)\,[R] \qquad [R'] = [R]_{vide}$$

L'indice de réfraction, n, varie avec la longueur d'onde $n^2 = 1 + a\lambda^2/(\lambda^2 - \lambda_v^2)$.

L'origine du pouvoir rotatoire des molécules, d'après la théorie quantique développée par Rosenfeld en 1928, est attribuée à une transition électronique possédant un moment électrique et un moment magnétique parallèle ou anti-parallèle. Le produit scalaire de ces deux moments donne l'intensité rotatoire de la transition. La théorie montre également que la valeur du pouvoir rotatoire dépend de la fréquence propre de la transition et de la fréquence de la lumière incidente.

$$[M'] = \frac{n^2 + 2}{3} \frac{96\,\pi\,N}{h\,c} \Sigma i\, R_i \frac{\nu_i^2}{\nu_i^2 - \nu^2} \qquad [M'] = [M]_{vide}$$

N, est le nombre d'Avogadro, h, la constante de Plank, c, la vitesse de la lumière, n, l'indice de réfraction, R_i, la force rotatoire de la i ième transition active, ν_i la fréquence de la i ième transition.

En posant : $\lambda = 1/\nu$, $\lambda_i = 1/\nu_i$ et $a_i = \frac{96\,\pi\,N}{h\,C} R_i$

on peut écrire : $$(M) = \Sigma_i \frac{a_i\ \lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2}$$

et on retrouve ainsi la loi de la dispersion rotatoire établie par Drude (1900) à partir de la théorie classique des oscillateurs électromagnétiques.

Dans la plupart des cas nous utiliserons la formule de Drude à un terme que nous écrirons : $[\alpha] = A/(\lambda^2 - \lambda^2)$, cette formule rend parfaitement compte de la dispersion rotatoire des polypeptides en pelote statistique et des protéines dénaturées. On obtient, dans ces cas là, un pouvoir rotatoire par résidu moyen, $[R]_D = -110°$ pour la raie D du sodium ; cette valeur peut varier de -100° à -120° suivant la composition en amino-acides des polypeptides. La valeur de la constante λ_c est obtenue graphiquement à partir d'une représentation linéaire de l'équation de Drude mise sous la forme :

$$1/[\alpha] = \lambda^2/A - \lambda_c^2/A$$

ou sous la forme $$[\alpha]\lambda^2 = [\alpha]\,\lambda_c^2 + A$$

- Dans la première représentation, on porte $1/[\alpha]$ en fonction de λ^2 ; la pente de la droite nous donne 1/A et par extrapolation, l'intersection de cette droite avec l'axe des λ^2, la valeur de λ_c^2.

- Dans la deuxième représentation on porte $[\alpha]\lambda^2$ en fonction de $[\alpha]$; la pente de la droite nous donne λ_c^2 et l'abcisse à l'origine la valeur de A.

Pour les protéines dénaturées par l'urée et pour les polypeptides en pelote statistique la valeur de λ_c est généralement égale à 212 mμ.

Pour les polypeptides en hélice α et les protéines contenant ce type de structure la lévorotation est beaucoup plus faible que pour les mêmes substances en pelote statistique et la dispersion rotatoire ne peut plus être représentée par l'équation de Drude à un terme mais par une équation contenant deux termes :

$$[\alpha] = A_1/(\lambda^2 - \lambda_1^2) + A_2/(\lambda^2 - \lambda_2^2)$$

comme viennent de le proposer récemment Shechter et Blout (1964) en prenant respectivement pour valeur de λ_1 et de λ_2 193 et 225 mμ.

Une équation similaire a été dérivée par Moffitt (1956) qui a montré à partir de considérations théoriques, que la dispersion rotatoire des molécules hélicoïdales peut être représentée par :

$$[R'] = a_o \frac{\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + b_o \left(\frac{\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} \right)^2$$

a_o est une constante dont la valeur dépend de la nature des amino-acides, la valeur de λ_o est généralement égale à 212 mμ, la valeur de b_o ne dépend que de la structure en hélice, elle est égale à :

$b_o = -630°$ pour l'hélice droite
$b_o = +630°$ pour l'hélice gauche
$b_o = 0°$ pour la pelote statistique en l'absence totale d'hélice.

La valeur des paramètres de l'équation de Moffitt est obtenue expérimentalement pour un polypeptide ou une protéine donnée en portant graphiquement $[R'].(\lambda^2 - \lambda^2)/\lambda^2$ en fonction de $(\lambda^2 - \lambda^2)/\lambda^2$, on obtient alors une droite dont la pente a pour valeur b_o et dont l'ordonnée à l'origine est égale à a_o.

Il a été trouvé que la valeur de b_o, dans le cas des polypeptides, est proportionnelle aux taux d'enroulement en hélice : $(b_o/-630).100 = x$ % d'hélice.

Lorsque le taux d'enroulement est faible la dispersion rotatoire peut être représentée correctement par l'équation de Drude à un terme :

$$[R'] = A/(\lambda^2 - \lambda_c^2)$$

et l'on peut démontrer que $\lambda_c^2 = (1 + b_o/a_o)\lambda_o^2$ (Pfuderer 1961).

Les formules précédentes ne sont plus valables lorsque la longueur d'onde de la lumière devient proche des longueurs d'ondes d'absorption sélective du chromophore dont les transitions électroniques induisent dans tout le spectre un pouvoir rotatoire. La courbe de dispersion rotatoire représentant la variation de $[\alpha]$ en fonction de λ devient alors "anormale"; il existe parallèlement à ce phénomène une absorption par le chromophore actif différente pour la lumière polarisée circulairement droite et gauche; ces deux phénomènes caractérisent ce que l'on appelle l'effet Cotton.

Dans la région des longueurs d'onde où l'on observe l'effet Cotton, le pouvoir rotatoire décroît, s'annule au niveau du maximum d'absorption du chromophore actif et change de signe (voir page 23). Il existe autant " d'effet Cotton " dans une molécule, qu'il existe du chromophores actifs différents.

Pour les polypeptides et les protéines possédant près de 100 % d'hélice, on distingue deux effets Cotton :

Un premier effet Cotton négatif avec un point d'inflexion à 225 mμ et un extrémum négatif à 233 mμ pour lequel $[R]_{233} = -12\,000°$. (Simmons *et al*, 1962).

Un deuxième effet Cotton positif à 191 mμ ayant son extrémum à 198 mμ avec $[R]_{198} = 80\,000°$ (Blout *et al*, 1962).

Ces deux effets Cotton disparaissent lorsque la structure en hélice s'effondre, le polypeptide en pelote statistique ne présente plus qu'un effet Cotton négatif de faible amplitude à 197 mμ.

Mesure de la fraction des résidus en hélice α dans les protéines :

Le passage de la structure en hélice α à la structure désordonnée en pelote statistique modifie considérablement la dispersion rotatoire des polypeptides en général. Tous les paramètres rotatoires sont affectés par ce changement de structure, si bien que l'on a pu établir des corrélations expérimentales entre la valeur des différents paramètres et le contenu en hélice de ces polypeptides. La fraction d'hélice α d'un polypeptide ou d'une protéine peut être donnée par :

$$\frac{b_o}{-630} \text{ ou } \frac{\lambda_c - 212}{140} \text{ ou } \frac{a_o - 30}{600} \text{ ou } \frac{\Delta[R]_D}{90} \text{ ou } \frac{\Delta[R]_{233}}{10\,000}$$

Si les écarts entre les valeurs des rapports obtenus sont trop grands on peut penser que l'on a plus le droit d'assimiler la structure de la protéine à un simple ensemble hélice-pelote et il y a lieu de tenir compte de l'existence d'autres structures telles que la structure β.

II.- SPECTROSCOPIE DE DIFFERENCE

Les nombreux travaux concernant l'absorption de la lumière par les protéines ont fait l'objet récemment d'importantes revues bibliographiques notamment par Beaven (1961) et par Wetlaufer (1962). Aussi nous ne donnerons qu'un bref résumé des principaux résultats utilisés dans ce travail.

L'absorption de la lumière par les protéines dans la région ultra-violette du spectre entre 2 000 et 3 000 Å est due essentiellement à la présence, dans la molécule, de résidus d'aminoacides aromatiques. Les spectres d'absorption de ces aminoacides, tryptophane, tyrosine et phénylalanine, présentent entre eux de grandes ressemblances : ils possèdent une bande d'absorption intense entre 2 100 et 2 200 Å et une bande d'absorption plus faible aux environs de 2 700 - 2 800 Å. L'intensité maximum et la forme de la bande d'absorption dans le proche ultraviolet est caractéristique de ces trois chromophores :

	ϵ	λ
tryptophane	5 500	2 780 Å
tyrosine	1 340	2 745 Å
phénylalanine	10	2 710 Å

Dans la même région du spectre une contribution à l'absorption est due à, la cystine $\epsilon = 150$ à 2 800 Å

Au-dessous de 2 000 Å l'absorption des protéines est due aux nombreux chromophores des groupes carboxyliques et aminés, mais principalement à la liaison peptidique ; les transitions électroniques, du groupe - CONH -, perturbées par la proximité du carbone assymétrique sont à l'origine du dichroïsme circulaire et de la dispersion rotatoire anormale dans cette région du spectre. Ces phénomènes constituent l'effet Cotton. Les interactions interamides, dans la structure hélicoïdale, créées par la présence de la liaison hydrogène, provoquent un hypochromisme important associé à un dédoublement de nature excitonique de la bande d'absorption conformément à la théorie de Moffitt. La valeur de l'hypochromisme à 1 900 Å a été utilisée par Urnes et Doty, (1961) pour mesurer le contenu en hélice α des polypeptides et des protéines. Cette région du spectre est cependant toujours peu étudiée du point de vue méthodologique en raison de certaines difficultés techniques.

On observe généralement que le spectre d'absorption des protéines est déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption du mélange de ses constituants. D'après Laskowski *et al* (1956) ce déplacement de spectre est dû à l'existence de la liaison peptidique, à l'absence de charges électriques au voisinage des chromophores et surtout à une différence " d'environnement" des résidus aromatiques dans la protéine par rapport à celui des aminoacides libres en solution aqueuse.

Ces déplacements de bande d'absorption ne sont jamais très importants, de l'ordre de 10 à 60 Å, aussi la méthode habituelle qui consiste à comparer deux spectres est-elle peu précise et l'on préfère alors utiliser une autre technique, appelée improprement " spectrophotométrie différentielle ", il est plus exact de l'appeler *spectrophotométrie de différences.*

Dans cette technique on enregistre directement, en fonction de la longueur d'onde, les différences d'absorption entre deux solutions dont on veut comparer les spectres. La référence n'est plus ici le solvant mais l'une des deux solutions à comparer. Il s'agit en général de deux solutions identiques au départ mais dont l'une a subi une modification. Le spectre de différence obtenu dans ce cas est entièrement dû à cette modification.

Dans l'étude des protéines les différences d'absorption observées sont couramment de l'ordre de quelques centièmes d'unité de densité optique aussi leurs mesures exigent-elles une très grande précision, l'usage d'un spectrophotomètre enregistreur à hautes performances est indispensable.

La nomenclature internationale pour décrire les modifications de spectres d'absorption est la suivante :

Le déplacement des bandes d'absorption vers les plus grandes longueurs d'ondes est appelé *déplacement bathochrome* et le déplacement des bandes vers les plus courtes longueurs d'ondes *déplacement hypsochrome.* Une augmentation de l'intensité de la bande d'absorption est appelée *effet hyperchrome* et une décroissance de cette intensité, *effet hypochrome.*

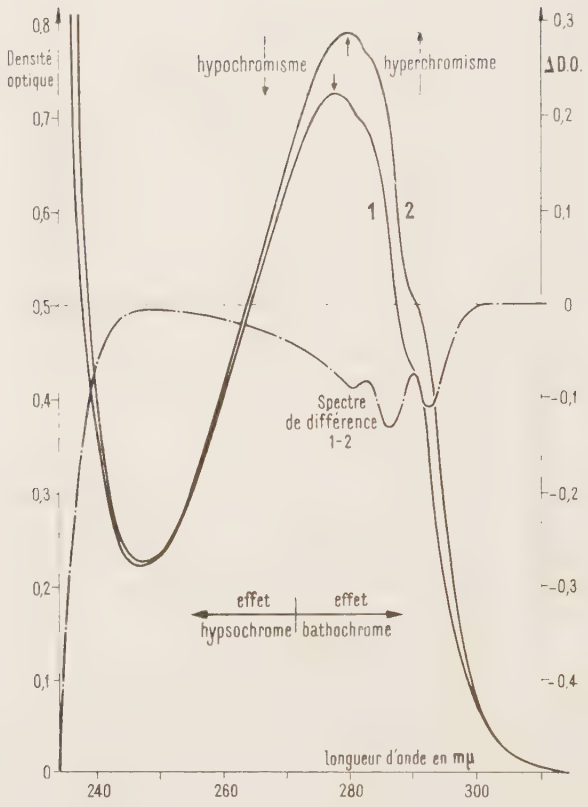


Fig. 2 - Spectres d'un mélange tyrosine-tryptophane dans le rapport 2 : 1

1 - en solution dans l'eau
2 - en solution hydro-alcoolique (17 % d'éthanol)
3 - spectre de différence 1 - 2.

La forme et la position de la bande d'absorption dépend de la nature du solvant. Généralement les solvants polaires tendent à déplacer la position de la bande et à diminuer sa structure vibrationnelle. L'effet solvant a été utilisé par Kasha (1950) pour distinguer les transitions électroniques $n \rightarrow \pi^*$ des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. Quand on augmente la polarité du solvant, un déplacement hypsochrome caractérise une transition $n \rightarrow \pi^*$ et un déplacement bathochrome, dans les mêmes conditions, caractérise une transition $\pi \rightarrow \pi^*$.

La spectrophotométrie de différence a permis d'observer que les déplacements de bandes d'absorption des protéines étaient souvent associés à des changements de structures de la molécule, que l'on peut mettre en évidence par spectropolarimétrie. Il existe de bonnes corrélations entre les variations d'absorption et les variations de pouvoir rotatoire des protéines, comme on peut l'observer dans le cas de la β-lactoglobuline (Pantaloni 1963) et dans le cas de la trypsine (D'Albis 1964) : nous observons, qu'à un déplacement hypsochrome correspond une augmentation de la lévorotation, et inversement, à un déplacement bathochrome correspond une diminution de la lévorotation de la protéine.

On admet généralement que le déplacement hypsochrome au cours de la dénaturation des protéines est dû au transfert de résidus aromatiques d'un milieu hydrophobe, peu polaire et de haute constante diélectrique, à un milieu plus polaire et moins réfringeant, c'est-à-dire en l'occurrence du sein de la protéine à sa surface au contact du solvant aqueux (Yanari et Bovey, 1960) (Foss 1961).

Dans certains cas cependant le déplacement du spectre d'absorption d'une protéine pourrait être dû semble-t'il, à la rupture d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle du groupe tyrosyle et un accepteur tel que le carboxylate (61 bis).

L'ionisation d'un groupe très proche d'un chromophore peut également modifier son spectre. Dans ce cas il n'y a pas nécessairement changement de structure de la protéine (Wetlaufer *et al*, 1958).

Des déplacements de bandes d'absorption très importants sont observés en milieu alcalin lors de l'ionisation du groupe phénolique de la tyrosine et en milieu acide lors de l'ionisation du noyau indole du tryptophane. Ces phénomènes sont utilisés pour titrer les résidus tyrosines et tryptophanes de la protéine et pour connaître leurs constantes d'ionisation.

La spectroscopie de différence est un moyen puissant d'investigation pour l'étude des changements de conformations des protéines en solution, nous avons vu que les changements de spectre à 1900 Å traduisent, comme les variations de dispersion rotatoire, des changements de structure secondaires du type hélice-pelote, tandis que les variations de spectre entre 2 500 et 3 100 Å traduisent plutôt des modifications d'interactions entre les chaînes latérales chromophores et le milieu environnant, c'est-à-dire des modifications de structure tertiaire ou quaternaire.

Les techniques spectropolarimétriques et spectrophotométriques se complètent l'une l'autre, nous les emploierons toujours corrélativement.

III.- MATERIEL UTILISE

La β-lactoglobuline est obtenue à partir de lait provenant de vaches homozygotes soit pour le caractère "β-lactoglobuline A" soit "β-lactoglobuline B". Nous employons pour la préparation, la technique de précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium de Palmer modifiée par Ogston et Cecil (1949). La protéine est recristallisée entre 3 et 6 fois. Pour une meilleure conservation la β-lactoglobuline est mise en solution concentrée en présence de sulfate d'ammonium à 50 % de saturation. Le matériel d'étude est toujours fraîchement recristallisé.

Les mesures de concentrations sont faites spectrophotométriquement, en solution saline (NaCl 0,1 M) au point isoélectrique ($E^{1\ \%}_{1\ cm}$ = 9,8 à 2780 Å).

Pour toutes les opérations de dilution nous employons des pipettes à strict ion ou des micro-seringues (Agla). L'erreur relative sur les concentrations est, dans ces conditions, inférieures à quelques millièmes.

Les mesures de pH sont faites à l'aide d'un pHmètre Radiometer T4 avec électrode de verre 222B et l'électrode au calomel K 140. Les solutions tampon de référence sont soit des solutions commerciales Radiometer ou Merk, soit des solutions étalonnées au laboratoire par rapport à l'électrode à hydrogène.

Pour l'étude de la dispersion rotatoire nous avons utilisé principalement un spectropolarimètre photoélectrique Rudolph à polariseur oscillant modèle 200 S 80 Q 655 et comme source lumineuse une lampe à vapeur de mercure SP 500 Philips. Les longueurs d'onde utilisées sont celles des principales raies d'émission du mercure : 578 - 546 - 436 - 365 - 334 et 313 mμ. Au-delà, l'absorption de la protéine ne permet plus de faire des mesures précises. Les tubes polarimétriques en silice fondue de 1 décimètre de long sont à ouverture latérale, les faces optiques sont fixes. Ces tubes possèdent une jaquette à circulation d'eau permettant d'assurer une régulation thermique au 1/10 de degré.

Nous avons utilisé pour l'étude des spectres d'absorption de la β-lactoglobuline le spectrophotomètre à double monochromateur Cary 15.

Cet appareil permet l'enregistrement de la densité optique, en fonction de la longueur d'onde, en fonction du temps ou les deux à la fois, dans l'intervalle de densité optique de 0 à 0,1 de 0 à 1 et de 1 à 2. Les cuves utilisées sont en quartz, le trajet optique est de 1 cm ± 0,01 mais ces cuves sont appariées de telle sorte qu'elles ne présentent entre elles que des différences au plus égales à 0,001 cm.

Pour l'étude des effets de température sur la protéine, entre 0 et 95°C la cuve est placée dans une jaquette à circulation d'eau, en laiton sur support isolant, qui permet en trois minutes d'atteindre pratiquement l'équilibre thermique à la température désirée. Cette température est maintenue constante au 1/10 de degré à l'aide d'un thermostat Haake.

CHAPITRE III

STRUCTURE DE LA β-LACTOGLOBULINE AU POINT ISOELECTRIQUE

Après ce bref aperçu sur les possibilités d'investigations que nous offrent les techniques de spectropolarimétrie et de spectrophotométrie pour l'étude de la structure des protéines et de leur changement de conformations, nous allons voir les renseignements que l'on peut obtenir :

1.- par l'étude de la courbe de dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline.

2.- par l'étude du spectre d'absorption de cette protéine.

I.- DISPERSION ROTATOIRE

1.- DONNEES EXPERIMENTALES

Nous avons mesuré en fonction de la longueur d'onde, entre 208 et 578 mμ le pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline B en solution aqueuse (NaCl 0,1 M à 20°C le pH obtenu étant alors de 5,25) et ceci pour des concentrations protéiques variant de 0,007 % à 10 %.

Les résultats moyens obtenus à partir d'un grand nombre de mesures sont donnés dans le tableau VI et représentés graphiquement par les courbes de la figure 3.

Nous remarquerons que la courbe de dispersion rotatoire d'abord régulière, de 578 mμ jusqu'aux environs de 300 mμ, devient anormale aux plus courtes longueurs d'ondes, dans la zone d'absorption de la protéine, et présente un effet Cotton négatif ayant le premier extrémum à 233 mμ et le point d'inflexion, correspondant à un pouvoir rotatoire nul, à 221 mμ. La valeur du pouvoir rotatoire spécifique de la β-lactoglobuline B au niveau de l'extrémum négatif est la suivante :

$$[\alpha]_{233} = -1730^{\circ} \quad \text{ou} \quad [R']_{233} = -1500^{\circ}$$

La partie normale de la courbe de dispersion rotatoire, entre 578 mμ et 313 mμ peut être parfaitement représenté par l'équation de Drude à un terme :

$$[\alpha] = A/(\lambda^2 - \lambda_c^2)$$

La représentation linéaire $1/\alpha$ en fonction de λ^2 de la figure 4, nous permet d'obtenir :

$$\lambda_c = 247 \text{ m}\mu \quad \text{et} \quad A = -8{,}25\ 10^6$$

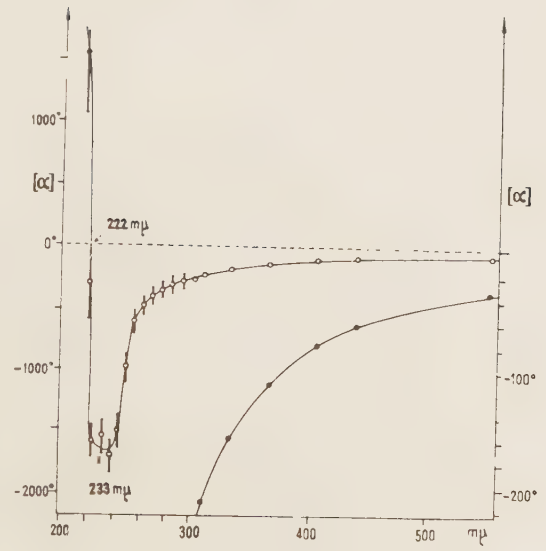


Fig. 3 - Dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline (pH 5,25, 20° C) représentée à 2 échelles différentes.

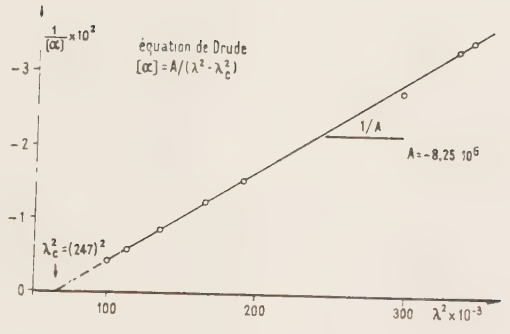


Fig. 4

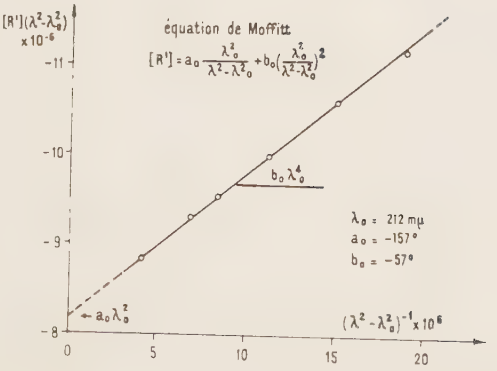


Fig. 5

TABLEAU VI

POUVOIR ROTATOIRE SPECIFIQUE DE LA β-LACTOGLOBULINE B A pH 5,25 $\mu = 0,1$ ET A 20°C

mμ	$[\alpha]^{20°}$	mμ	$[\alpha]^{20°}$	mμ	$[\alpha]^{20°}$
589	- 29	313	-220	250	-1000
578	- 30	303	-250	244	-1500
546	- 36	294	-270	238	-1700
436	- 64	285	-290	232	-1600
405	- 80,3	278	-340	227	-1600
365	-113,5	270	-400	222	- 300
334	-162	263	-460	217	+1500
313	-220	256	-670	213	+5000

(la valeur de $[\alpha]_{589}$ a été obtenue par extrapolation)

- De 313 à 578 mμ les mesures sont faites à l'aide du spectropolarimètre Rudolph (200 S 80 Q 655) et pour des concentrations protéiques variant de 0,3 à 10 %. L'erreur sur la valeur du pouvoir rotatoire spécifique est de l'ordre de ± 1°.

- De 213 à 313 mμ les mesures ont été faites à l'aide du spectropolarimètre Bendix et Ericson et pour une concentration en β-lactoglobuline de 0,007 %.

L'erreur sur la valeur du pouvoir rotatoire spécifique au niveau de l'extrémum négatif de l'effet Cotton est de l'ordre de ± 8 %.

A partir des valeurs de $[\alpha]$ données dans le tableau VI, nous pouvons calculer le pouvoir rotatoire par résidu moyen, corrigé de l'indice de réfraction de l'eau pour la longueur d'onde considérée, $[R']$:

$$[R'] = 3/(n^2 + 2).\ \overline{MRm}/100\ [\alpha]$$

Pour la β-lactoglobuline possédant 162 résidus (M = 18 000) la masse "molaire" moyenne d'un résidu d'amino-acide est de :

$$18\ 100 : 162 = 110,3$$

Le facteur de correction de Lorentz, $3/(n^2 + 2)$, pour les solutions aqueuses diluées à 20°C est voisin de 0,79 entre 589 et 313 mμ.

$$\text{donc}\quad [R']_\lambda = 0,87\ [\alpha]_\lambda$$

Bien que la dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline obéisse à la loi simple de Drude, il est possible de rendre compte de cette dispersion rotatoire par l'équation plus complexe de Moffitt (voir p. 15) dont la représentation linéaire (fig. 5) $[R'](\lambda^2 - \lambda^2)$ en fonction de $(\lambda^2 - \lambda^2)^{-1}$, nous permet de calculer avec $\lambda_o = 212$ mμ

$$b_o = -56° \quad \text{et} \quad a_o = -157°$$

La valeur de λ_c obtenue à l'aide de la relation déjà vue : $\lambda_c^2 = (1 + b_o/a_o)\lambda_o$, est de 247 m$\mu$: donc en excellent accord avec celle tirée de l'équation de Drude.

2.- INTERPRETATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

Les valeurs des constantes rotatoires que nous avons obtenues pour la β-lactoglobuline ne peuvent nous renseigner sur la structure de cette molécule que si nous pouvons les comparer à celles obtenues pour des protéines ou des polypeptides de synthèse dont la structure est bien connue par ailleurs.

Les protéines, et les polypeptides de façon générale, peuvent exister théoriquement dans différents types de conformations, soit régulières et périodiques comme les structures en hélice, soit complètement désordonnées à l'état de pelote statistique. Nous n'envisagerons ici que les quatre types de structures pour lesquels ont été établies des corrélations expérimentales avec les paramètres rotatoires. Ce sont : l'hélice α droite, l'hélice α gauche, la structure β et la pelote statistique.

Nous donnons ci-dessous les valeurs des constantes rotatoires qui, d'après les nombreuses données de la littérature, nous semblent caractériser le mieux ces quatre types de structures polypeptidiques (103) (104) (127).

Type de structure	$[R']_D$	$[R']_{233}$	a_o	b_o
I hélice α droite	± 15°	- 13 000°	+ 30°	- 630°
II hélice α gauche	-130°	+10 000°	- 1200°	+630°
III structure β	+ 70°		+ 600°	+190°
IV pelote statistique	- 85°		- 570°	0°

D'après les valeurs des constantes rotatoires de la β-lactoglobuline :

$$[R']_D = -26°, \quad [R']_{233} = 1500°, \quad a_o = -157° \quad \text{et} \quad b_o = -57°,$$

nous ne pouvons pas dire que cette protéine possède un de ces quatre types de conformation. Il en est de même pour la plupart des protéines globulaires à l'état natif.

Les protéines globulaires semblent donc posséder des segments de chaîne polypeptidique de structures différentes. Dans ce cas l'analyse des données expérimentales n'est facile que si la molécule possède seulement deux principaux types de structure ; par exemple l'hélice droite et la pelote statistique. Il est alors possible, le pouvoir rotatoire étant une grandeur additive, d'évaluer le pourcentage relatif de ces deux structures.

Dans le but de permettre une détermination simple et une évaluation semi-quantitative des différents types de configurations que possède une protéine ou un poly-amino-acide, nous proposons une représentation graphique où ces molécules sont représentées par un point qui a pour coordonnées les valeurs de a_o et de b_o. La position du point sur le diagramme indique à quel type des quatre structures connues, ou à quelle combinaison de ces quatre structures, appartient le polypeptide.

Nous avons choisi les paramètres a_o et b_o pour cette représentation car à partir de leurs valeurs et dans les limites de validité de l'équation de Moffitt les autres paramètres sont déterminés :

Par exemple $[R']_D = 0{,}149\ a_o + 0{,}222\ b_o$ et $[\alpha]_D = 1{,}15\ [R']_D$

et dans les limites de validité de la loi de Drude on a :

$$\lambda_c = (1 + b_o/a_o)^{1/2}\ 212$$

La valeur de $[R']_{233}$ par contre n'est pas liée directement à celle de a_o et de b_o, c'est donc un élément supplémentaire d'information qui viendra s'ajouter aux autres.

Sur ce diagramme (fig. 6) les poly-amino-acides et les protéines modèles, ayant servi à établir les paramètres rotatoires des différents types de structures, occupent des sites nettement distincts et par là même, caractéristiques de ces structures.

Les protéines ayant un point figuratif placé entre deux sites doivent posséder un mélange des deux conformations types représentées par les deux sites en question. Le rapport des deux formes en présence est égal à l'inverse du rapport des distances du point à chacun des deux sites.

Les protéines représentées par un point compris entre trois sites, possèdent au moins trois types de structure dans leur conformation moléculaire. Le pourcentage de ces différentes formes de structure peut être obtenu graphiquement en procédant par étapes.

Cependant si d'après la position du point sur le graphique nous supposons qu'une protéine contient à la fois, par exemple, des segments de chaîne peptidique en hélice α droite, en structure β et pelote statistique, il est plus simple de résoudre le système d'équation suivant :

$$b_o = f_\alpha\,(b_o^\alpha) + f_\beta\,(b_o^\alpha) + f_p\,(b_o^p)$$

$$a_o = f_\alpha\,(a_o^\alpha) + f_\beta\,(a_o^\alpha) + f_p\,(a_o^p)$$

$$f_\alpha + f_\beta + f_p = 1$$

où f_α, f_β et f_p sont respectivement les fractions de chaîne peptidique en hélice α, en structure β et en pelote statistique que nous voulons connaître sachant que :

$$b_o^\alpha = -630°,\ b_o^\beta = 190°\ \text{et}\ b_o^p = \quad 0°$$

et

$$a_o^\alpha = +\ 30°,\ a_o^\beta = 600°\ \text{et}\ a_o^p = -570°$$

On en tire :

$$f_\alpha = \frac{b_o - 190\ f_\beta}{-630} \qquad f_\beta = \frac{a_o + b_o + 570}{1360},\ \text{et}\ f_p = 1 - f_\alpha - f_\beta$$

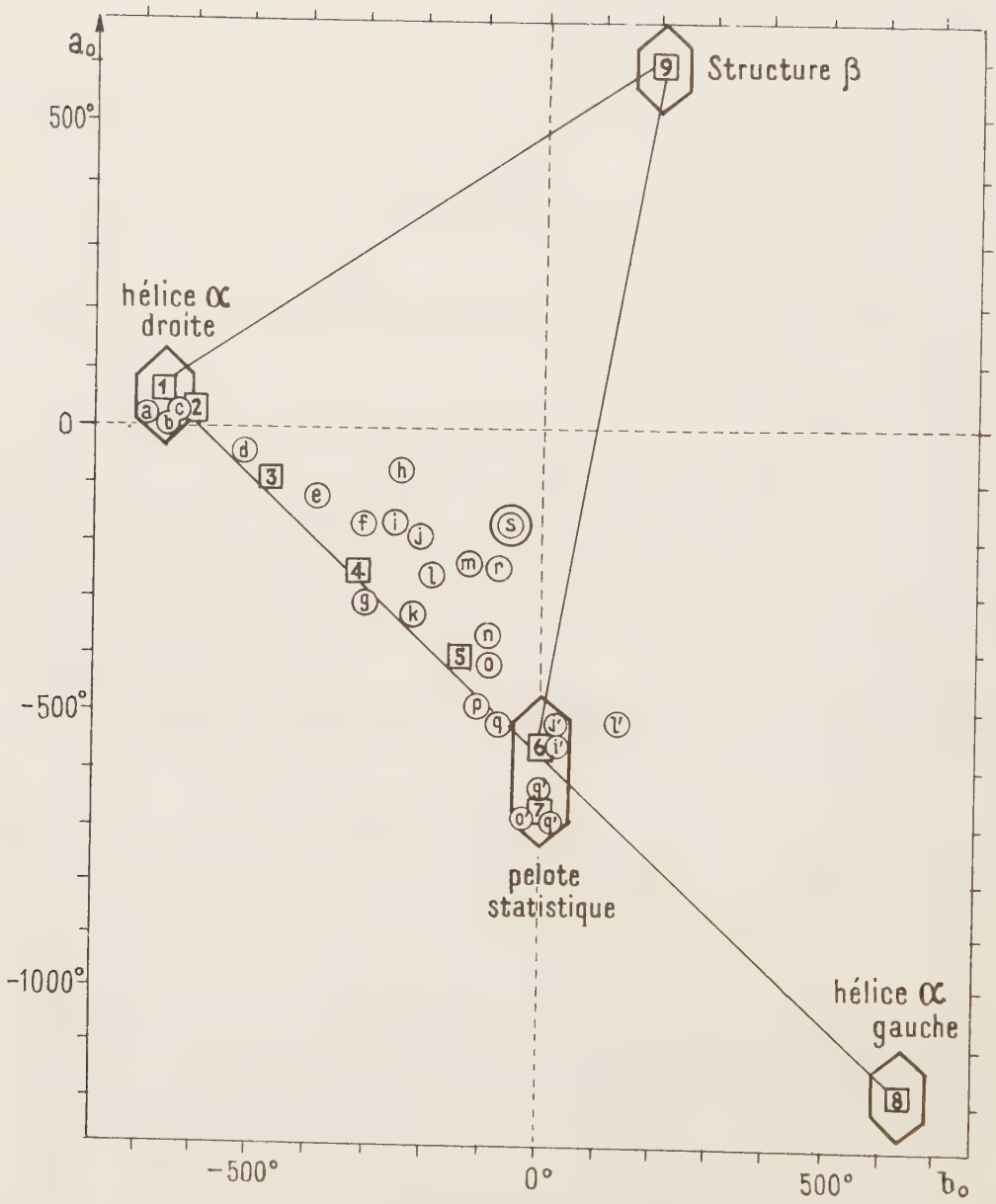


Fig. 6 - Diagramme permettant d'évaluer les proportions des différents types de structures dans une molécule protéique.

- FIGURE 6 -

Copolymères de

L-glu-L-lys
à pH 3, (Blout 1958).

	composition glu/lys.	pourcentage *d'hélice α droite.*
1	10/0	100
2	7/3	90
3	6/4	70
4	5/5	50
5	4/6	25
6	0/10	0

7	poly-L-glu à pH 8	*pelote statistique*
8	poly-L-Aspartate pH 3	*hélice α gauche*
9	poly-L-sérine	*structure β.*

(valeur extrapolée).

Protéines

a	méromyosine I
b	tropomyosine
c	paramyosine
d	méromyosine II
e	myosine
f	méromyosine (lourde)
g	sérumalbumine bovine
h	globine (myo)
i	insuline
j	ovalbumine
k	fibrinogène
l	lysozyme
m	histone
n	globine (Hb)
o	chymotrypsine
p	ribonucléase
q	chymotrypsinogène
r	trypsine
s	β-lactoglobuline.

Fig. 7

Pour la β-lactoglobuline nous obtenons ainsi :

$$f_\alpha = 0,17 \quad f_\beta = 0,26 \quad \text{et} \quad f_p = 0,57$$

Les formules normalement employées pour déterminer la fraction de résidus en hélice α dans un polypeptide (voir page 16) nous donnent, pour la β-lactoglobuline, les valeurs suivantes :

	$\frac{b_o}{630}$	$\frac{a_o}{600}$	$\frac{\lambda_c - 212}{140}$	$\frac{\Delta [R']_D}{90}$	$\frac{[R']_{233}}{10\ 000}$
f_α :	0,09 ;	0,26 ;	0,25 ;	0,45 ;	0,15

On observe de gros écarts entre ces différentes valeurs, mais on sait que les méthodes de calcul utilisées ne sont réellement valables que si la structure de la molécule correspond au modèle hélice α-pelote : cela ne semble donc pas être le cas de la β-lactoglobuline. La valeur du pouvoir rotatoire dans la région d'effet Cotton, à 233 mμ, n'est pas affectée par la présence de structure β, elle doit donc nous donner une assez bonne valeur de $f\alpha$. Nous remarquerons que cette valeur, $f\alpha = 0,15$, est peu différente de la valeur que nous avons obtenue plus haut, $f\alpha = 0,17$, à partir de a_o et b_o mais en tenant compte de la contribution de la structure β,

Le fait que la plupart des protéines globulaires, comme le montre la figure 6, ne se placent pas sur la droite caractéristique des structures hélice α-pelote, indique que ces protéines possèdent un certain pourcentage de résidus en conformation β ou tout autre type de structure ayant nécessairement une valeur de a_o plus grande que celle correspondant à la pelote statistique. Cette autre structure, nous le verrons par spectrophotométrie d'absorption, pourrait être une pelote statistique compacte de l'intérieur de laquelle le solvant aqueux serait exclu.

II.- SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION

Le spectre d'absorption de la β-lactoglobuline en solution aqueuse, au point isoélectrique, a été enregistré de 3 300 Å jusqu'à 1 850 Å, limite de transparence de l'eau. Nous avons représenté sur la figure 7 la variation du logarithme du coefficient d'extinction spécifique en fonction de la longueur d'onde. Dans le tableau VII, nous donnons les valeurs des coefficients d'extinction spécifique et d'extinction moléculaire pour quelques longueurs d'onde caractéristiques.

Le spectre d'absorption de la β-lactoglobuline (figure 7), ne nous apprend rien que nous ne connaissions déjà quant à la composition en groupes chromophores de la protéine, qui contient, rappelons-le, 5 phé, 4 tyr, 2 try et 2 cystines par protomère. Les noyaux phénol des quatre résidus tyrosine et les noyaux indole des deux résidus tryptophane contribuent à eux seuls à 98 % de l'absorption de la protéine entre 2 500 et 3 200 Å. Aux environs de 2 200 Å, nous distinguons nettement un point d'inflexion dû à la présence de la deuxième bande d'absorption des chromophores aromatiques, laquelle se superpose à la bande d'absorption due aux groupements amides de la liaison peptidique qui possède un maximum au voisinage de 1 900 Å.

La valeur du coefficient d'extinction moléculaire de la β-lactoglobuline native à 2 780 Å est, nous l'avons vu, égale à 17 700. Or la somme des coefficients d'absorption de chacun des chromophores contenus dans la protéine laisserait prévoir pour celle-ci une valeur de ϵ égale à 16 400 soit plus de 10 % inférieur à celui trouvé expérimentalement.

TABLEAU VII

Longueurs d'onde en Å	$E^{1\%}_{1\ cm}$	$\epsilon \times 10^{-3}$ (M = 18 200
3000	2,0	3,6
29 00	6,66	12
2820	9,7	17,5
2780	9,8	17,7
2500	3,5	6,4
2200	11,5	208
2100	21,3	386
2000	50	910
1950	71,5	1300
1900	84	1530

Pour mieux comprendre l'origine de cette différence, nous avons comparé le spectre d'absorption de la β-lactoglobuline à celui d'un mélange d'amino-acides aromatiques ayant la même composition que la protéine. Nous remarquons alors que non seulement la β-lactoglobuline a une absorption plus forte que celle des amino-acides libres mais encore que son spectre est nettement déplacé vers les grandes longueurs d'onde, d'environ 50 Å, par rapport à ceux-ci,

Nous nous sommes demandés qu'elles étaient les causes de cette différence de spectre; a priori elles peuvent être nombreuses (4) (129) :

1.- la présence d'un dipôle permanent, $COO^- RNH_3^+$, à proximité du chromophore dans le cas l'aminoacide libre à pH 5,2,

2.- l'absence de liaison peptidique dans le mélange d'acides aminés,

3.- la présence d'interactions avec les groupes adjacents sur la chaîne peptidique dans la protéine,

4.- la présence d'interactions spécifiques entre les chromophores et des groupes situés sur des segments éloignés de la chaîne peptidique.

5.- une différence d'environnement non spécifique des chromophores dans la protéine et dans le mélange d'amino-acides libres.

Enfin, plusieurs de ces causes peuvent intervenir simultanément. Pour savoir lesquelles d'entre elles jouent un rôle important, nous avons fait les expériences suivantes :

Nous avons remplacé les amino-acides aromatiques de l'expérience précédente par leurs dérivés méthyl-ester, afin de diminuer l'influence de la charge au voisinage des chromophores. Les résultats obtenus sont comparables aux précédents, ce qui prouve que la charge du carboxylate ne joue pas un rôle important dans la modification du spectre.

Dans une autre expérience nous avons enregistré le spectre d'une solution de β-lactoglobuline A par rapport à une solution de β-lactoglobuline A hydrolysée par la trypsine. Le tracé du spectre de différence est alors (fig. 9) assez semblable à celui que nous avons obtenu en comparant l'absorption de la β-lactoglobuline native à celle du mélange d'amino-acides aromatiques. Après l'hydrolyse trypsique, la β-lactoglobuline présente à 2 800 Å une hypochromicité de 11,3 %; on obtient alors pour le coefficient d'extinction une valeur proche de celle calculée plus haut à partir des coefficients d'extinction des constituants.

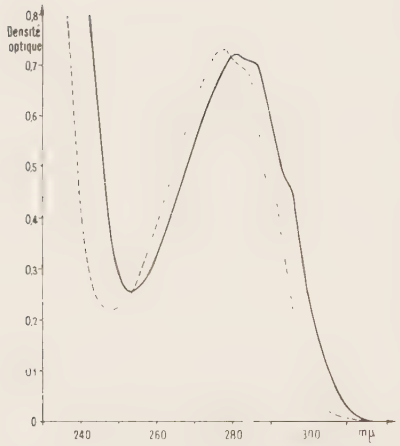


Fig. 8

Spectre d'absorption de la β-lactoglobuline en solution NaCl 0,1 M. C = 0,73 mg/ml.

Spectre d'un mélange tyrosine-tryptophane dans le même rapport (2 : 1) que dans la molécule de β-lactoglobuline - solution en NaCl 0,1 M.

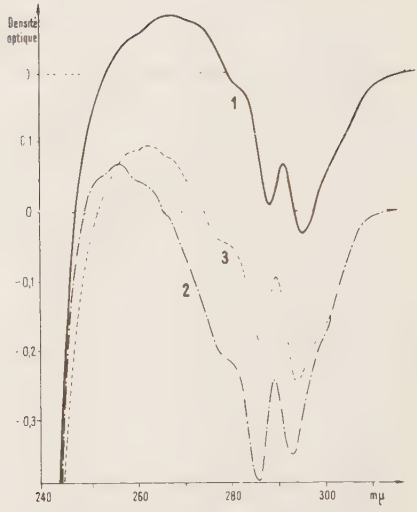


Fig. 9

Spectre de différence de la β-lactoglobuline par rapport au mélange tyr-try. (Cf. fig. 8).

Spectre de différence de la β-lactoglobuline hydrolysée par la trypsine, par rapport à la β-lactoglobuline native et à la trypsine - les deux solutions étant en HCl N/100. C_L = 1,8 mg/ml.

Même expérience que la précédente mais les deux solutions à comparer contiennent en plus 50 % d'éthylène glycol.

Pour obtenir avec la β-lactoglobuline hydrolysée, ou avec le mélange d'acides aromatiques, un spectre d'absorption semblable à celui de la β-lactoglobuline native, *il faut ajouter au solvant aqueux 67 % d'éthanol.* Cette valeur est celle pour laquelle nous obtenons un hyperchromisme de 11,3 % à 2 800 Å.

Les spectres de différences de la β-lactoglobuline hydrolisée sont nettement modifiés par l'addition d'éthanol ou d'éthylène glycol au solvant alors que ceux de la β-lactoglobuline native ne le sont que très peu dans les mêmes conditions. En présence de quantités croissantes d'éthylène glycol dans le solvant, le spectre de différence que présente la β-lactoglobuline hydrolysée par rapport à la β-lactoglobuline native s'atténue progressivement.

Avant d'essayer d'interpréter ces résultats, il est bon de remarquer que des 161 liaisons peptidiques de la β-lactoglobuline, la trypsine n'hydrolyse que les 18 liaisons peptidiques où le carbonyl appartient aux résidus lysine ou arginine. Il est donc peu vraisemblable que la différence de spectre apparaissant au cours de l'hydrolyse tryptique soit due à la libération des groupes aminés appartenant aux deux résidus tryptophane et aux quatre tyrosines; cette probabilité est égale à :

$$\frac{6\,!}{161 \times \ldots (161 - 6 + 1)} \cdot \frac{18}{6} = 2{,}1\ 10^{-10}$$

Quand bien même un résidu tryptophane et un résidu tyrosine seraient les seuls chromophores apparus aux extrémités N terminales au cours de l'hydrolyse trypsique, ce qui est encore peu probable ($2{,}7\ 10^{-3}$), cela serait insuffisant pour expliquer la différence de spectre observée.

Nous pouvons donc affirmer que la modification de spectre, déplacement hypsochrome et effet hypochrome, apparue lors de l'hydrolyse trypsique de la β-lactoglobuline, ne peut être expliquée de façon satisfaisante par les hypothèses 1, 2 et 3 formulées plus haut. Par contre, l'hypothèse 4, impliquant la présence d'interactions spécifiques entre les chromophores et d'autres groupes dans la protéine native ne peut être entièrement repoussée ; cependant, le fait que le spectre de différence entre β-lactoglobuline hydrolysée et β-lactoglobuline native ressemble à celui obtenu entre amino-acides aromatiques en solution aqueuse et en solution hydro-alcoolique, semble plutôt indiquer qu'il s'agit d'interactions non spécifiques telles que celles dues à un " environnement " peu polaire des chromophores dans la protéine native.

On pourrait être tenté, d'après les expériences précédentes, de comparer l'environnement des chromophores dans la β-lactoglobuline native au mélange éthanol-eau à 67 % ; en fait cette estimation ne tient pas compte de ce que dans une solution hydro-alcoolique il doit y avoir, vraisemblablement, solvatation préférentielle des groupes aromatiques par les molécules d'alcool.

Ces expériences nous permettent d'affirmer que dans la protéine native les groupes hydrophobes forment un " environnement " peu polaire aux résidus aromatiques ; de plus ces groupes chromophores sont peu accessibles aux molécules de solvant. Il est donc raisonnable de penser que groupes apolaires, y compris les noyaux aromatiques, sont enfouis à l'intérieur de la molécule, délimitant une ou plusieurs régions hydrophobes. Les groupes polaires seraient exposés à la surface au contact du solvant aqueux.

Cette structure permet de comprendre que la β-lactoglobuline native soit très soluble dans l'eau en présence de sel, en dépit du fait que la grande majorité de ses résidus soit apolaire. L'insolubilité de la protéine au point isoelectrique après dénaturation, confirme cette façon de voir.

La β-lactoglobuline possèderait donc une structure du type micellaire que l'on peut considérer, en quelque sorte, comme une adaptation à la solubilité dans l'eau.

En dehors de cet aspect général de la structure de la β-lactoglobuline où les interactions non spécifiques semblent jouer un rôle important, il existe, nous le verrons plus loin, des intéractions très spécifiques qui jouent un rôle de premier plan dans les mécanismes de transconformation de la protéine. Cependant, dès à présent nous pouvons remarquer, sur les spectres de différence de la β-lactoglobuline hydrolysée par rapport à la β-lactoglobuline native, la présence d'un épaulement à 3 000 Å. Cet épaulement, sur la bande caractéristique du tryptophane n'existe pas dans le spectre de différence de la β-lactoglobuline hydrolysée, en solution aqueuse, par rapport à la β-lactoglobuline hydrolysée, en solution hydro-alcoolique. Cet épaulement pourrait donc être dû à la présence d'une intéraction spécifique entre un résidu tryptophane et un autre groupe de la protéine qui pourrait être, nous l'étudierons plus loin, le groupe thiol masqué de la β-lactoglobuline.

CHAPITRE IV

ETUDE DES CHANGEMENTS DE STRUCTURES REVERSIBLES DE LA β -LACTOGLOBULINE AU-DESSUS DU POINT ISOELECTRIQUE

INTRODUCTION

L'étude des changements de structure de la β-lactoglobuline en solution aqueuse à des pH supérieurs à son point iso-électrique a déjà fait l'objet de nombreuses études, principalement dans le laboratoire de J. Tonnelat (33), (34), (84), (87) et d'autre part, dans le laboratoire de C. Tanford (113), (115), (116).

Rappelons que C. Georges et S. Guinand (33) (34) ont montré dans des travaux sur l'étude de la lumière diffusée par des solutions de lactoglobuline et sur l'étude de la vitesse de sédimentation en fonction de la concentration, du pH, de la force ionique et de la température, que cette protéine subit entre pH 6 et 9 un changement rapide et réversible de sa masse moléculaire moyenne dû à l'existence d'un équilibre monomère-dimère. Cet équilibre est déplacé vers la forme monomère (18000) par élévation du pH, sans toutefois qu'il soit possible d'obtenir une dissociation complète à 20° C car au-delà de pH 8,5 la variation de masse moléculaire semble indépendante de la valeur du pH. Par élévation de la température la dissociation est augmentée et ce n'est qu'à la température de 50° C que la dissociation est presque totale en milieu alcalin.

D'autre part, en étudiant le titrage de la β-lactoglobuline Tanford *et al* (113), ont mis en évidence l'existence de 2 carboxyles de constantes d'ionisation anormalement élevées, titrable dans la zone de pH caractéristique des imidazoles. Comme l'a montré Tanford, le comportement anormal des deux carboxyles est dû au fait que l'ionisation de ces groupes est liée au changement de structure de la protéine, changement de structure qui a été observé par polarimétrie. Mais pour cet auteur, se référant aux travaux anciens de Pedersen, il s'agit d'un changement de structure sans changement de masse moléculaire, celle-ci étant supposée demeurer égale à 35 000.

Or nous avons vu que la β-lactoglobuline se dissocie réversiblement en monomères dans cette zone de pH. La première question que nous nous sommes posés était de savoir si le changement de structure observé par Tanford *et al* était autre chose qu'un aspect du phénomène de dissociation de la β-lactoglobuline mis en évidence par C. George et S. Guinand : c'est-à-dire un changement de masse moléculaire sans changement de structure tertiaire. Nous verrons plus loin comment il nous a été possible de prouver qu'il existe réellement un changement de structure moléculaire distinct de la dissociation.

Mais alors, comme il est peu vraisemblable que trois phénomènes différents, ionisation anormale, transconformation et dissociation, se produisent fortuitement de façon concomitante dans la même zone de pH, on peut se demander s'il existe une cause commune à ces phénomènes, ou si l'un d'eux n'est pas la cause des autres ou encore si chacun de ces phénomènes n'est pas dépendant des deux autres, en d'autres termes on peut se demander s'il ne s'agit pas de 3 phénomènes liés par des interactions réciproques. Cette dernière hypothèse est la plus complexe mais aussi la plus générale car toutes les autres peuvent être considérées comme n'étant que des cas particuliers de celle-ci.

L'étude de ces phénomènes comme la plupart des phénomènes physiques présente deux aspects, l'un théorique, l'autre expérimental, bien que souvent l'expérience ait précédé la théorie; nous avons pensé qu'il était souhaitable de présenter en deux chapitres consécutifs d'abord l'étude théorique et ensuite, comme une application de cette théorie, l'étude expérimentale.

La terminologie relative aux protéines globulaires que nous utilisons est celle adoptée par Changeux, Ullman et Monod (1963):

a) les protéines globulaires comprenant un nombre fini et relativement petit de sous-unités identiques *sont dites* oligomères;

b) le terme de protomère *sera employé pour désigner les sous-unités identiques associées dans une protéine oligomère;*

c) le terme de monomère *désigne le protomère à l'état dissocié.*

CHAPITRE IV — PREMIERE PARTIE

ETUDE THEORIQUE DES CHANGEMENTS DE LA CONFORMATION TERTIAIRE ET QUATERNAIRE DES PROTEINES ASSOCIES A LA FIXATION SPECIFIQUE D'UN PROTON

"Si une molécule de protéine peut exister sous deux conformations, α et β, et si la constante d'équilibre $(\alpha)/(\beta)$ dépend du pH, alors une conséquence nécessaire des lois de la thermodynamique est qu'au moins un groupe titrable possède un pK différent dans les deux conformations".

Charles Tanford (1961)

Le changement de structure intramoléculaire associé à l'ionisation d'un ou plusieurs groupes titrables d'une protéine a été étudié de façon magistrale par Tanford. Nous reprendrons d'abord l'essentiel de cette étude théorique et, sur les mêmes bases de raisonnement, nous établirons, dans le cas d'une dissociation moléculaire réversible, les équations exactes exprimant les relations entre la variation de la constante d'équilibre de dissociation en fonction du pH et la courbe de titrage du groupe impliqué dans ce phénomène, dans le cas où les répulsions électrostatiques ne jouent pas un rôle important.

Nous étudierons ensuite, toujours d'un point de vue théorique, le cas d'un modèle complexe où une dimérisation et une transconformation sont associées à l'ionisation d'un groupe titrable.

Cette étude, comme celle de Tanford, peut être considérée comme un développement, sur quelques points particuliers, de la théorie générale des fonctions liées et effets réciproques proposée par J. Wyman (1948, 1964).

I.- TRANSCONFORMATION LIEE A UNE IONISATION

Ce sujet a été traité par Tanford; cependant il nous a semblé utile de reprendre cette étude en insistant sur certains points qui, peu développés par cet auteur, nous seront utiles par la suite. Nous introduirons dès à présent les symboles que nous utiliserons dans l'étude des autres modèles.

Supposons avec Tanford qu'une protéine puisse exister dans deux conformations différentes et que l'équilibre entre les deux formes soit fonction de l'état d'ionisation d'un simple groupe titrable aH.

Nous représenterons par (PH) et (P'H) la concentration des molécules ayant le groupe aH non dissocié dans les deux conformations et par (P) et (P') la concentration des molécules des deux formes ayant le groupe *a* sous sa forme basique. Au cours de cette étude nous confondrons la concentration des molécules protéiques avec leur activité. Nous pouvons alors écrire les deux constantes d'équilibre distinctes de transconformation relatives aux équilibres $PH \rightleftharpoons P'H$ et $P \rightleftharpoons P'$

$$K_{t1} = \frac{(P'H)}{(PH)} \quad (1,1) \quad \text{et } K_{t2} = \frac{(P')}{(P)} \quad (1,2)$$

Si les constantes K_{t1} et K_{t2} étaient égales, notre étude serait sans objet car la transconformation serait indépendante de l'ionisation. Nous poserons arbitrairement : $K_{t2} > K_{t1}$.

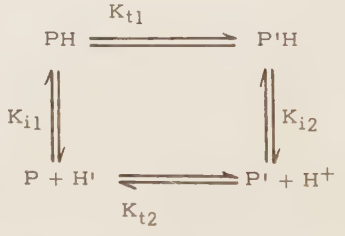
Cette inégalité implique que la protéine transconformée représentée ici par l'indice (') a une probabilité d'existence accrue lorsque le groupe *a* est sous sa forme basique. Tanford en posant :

$K_{t1} < 1$ et $K_{t2} > 1$ fait une restriction supplémentaire qui ne nous semble pas absolument nécessaire.

Il existe également deux expressions pour la constante d'ionisation du groupe aH dans les deux conformations :

$$K_{i1} = \frac{(P)\,(H^+)}{(P\,H)} \quad (1,3) \qquad K_{i2} = \frac{(P')\,(H^+)}{(P'\,H)} \quad (1,4)$$

En considérant qu'il existe deux chemins pour passer de l'état PH à l'état P', on obtient deux expressions équivalentes pour la constante de l'équilibre global $PH \rightleftharpoons P' + H^+$ que l'on peut écrire : $K_{t1} \cdot K_{i2} = K_{t2} \cdot K_{i1}$ (1,5),



ceci met en évidence que K_{i1} est nécessairement plus petit que K_{i2} si comme nous l'avons supposé K_{t2} est plus grand que K_{t1} : c'est-à-dire, en d'autres termes, que P'H est un acide plus fort que PH si la transconformation est favorisée par l'ionisation du groupe aH de la protéine.

Remarquons avec Tanford que le fait de supposer que le groupe aH soit le seul à effectuer, par son ionisation, l'équilibre de transconformation, revient à supposer que tous les autres groupes titrables ont la même constante de dissociation dans les deux conformations. (Tanford montre également que les interactions électrostatiques non spécifiques peuvent être incorporées dans ce modèle).

En face d'un tel mécanisme on peut se demander quelle est la signification des constantes d'équilibre globales ou apparentes que l'on obtient. Pour répondre à cette question il est commode d'introduire deux paramètres : la fraction de molécules transformées x_t et la fraction de molécules x_i ayant le groupe particulier *a* sous sa forme basique.

$$x_i = \frac{(P) + (P')}{(P) + (P') + (PH) + (P'H)} \quad (1,6) \qquad x_t = \frac{(P') + (P'H)}{(P') + (P'H) + (P) + (PH)} \quad (1,7)$$

En utilisant les équations (1,1) à (1,7) données plus haut, nous pouvons exprimer x_i et x_t sous la forme suivante :

$$x_i = \frac{1}{1 + \frac{(H^+)}{K_{i1}} \frac{1 + K_{t1}}{1 + K_{t2}}} \quad (1,8) \qquad x_t = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_{t2}} \frac{1 + (H^+)/K_{i1}}{1 + (H^+)/K_{i2}}} \quad (1,9)$$

En faisant varier l'activité des ions hydrogène entre 0 et ∞, la valeur de x_i varie de 1 à 0 et corrélativement la valeur de x_t varie entre deux limites qui ont pour expressions :

En milieu acide, $(H^+) \rightarrow \infty$

$$x_{t1} = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_{t2}} \frac{K_{i2}}{K_{i1}}}$$ et en utilisant la relation (1,5) on a :

$$x_{t1} = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_{t1}}} \quad (1,10)$$

En milieu alcalin, $(H^+) \rightarrow 0$

$$x_{t2} = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_{t2}}} \quad (1,11)$$

Or expérimentalement lorsque nous étudions une transconformation en fonction du pH nous ne mesurons qu'un taux de conversion apparent entre un état initial et un état final, c'est-à-dire entre x_{t1} et x_{t2} dont nous ne connaissons généralement pas la valeur. Ce taux de conversion apparent y_t est égal à :

$$y_t = \frac{x_t - x_{t1}}{x_{t2} - x_{t1}}$$

A partir des expressions (1,5) et (1,9) à (1,11) nous avons calculé la valeur de y_t. Nous retrouvons le résultat obtenu par Tanford :

y_t possède la même expression (1,8) que x_i

$$\boxed{y_t = x_i}$$

Ce résultat montre que les courbes de transition en fonction du pH que nous pouvons obtenir par polarimétrie, par spectrophotométrie ou toute autre technique capable de nous donner y_t, sont identiques à la courbe de titrage du groupe anormal impliqué dans la transconformation de la protéine. L'intérêt de ce résultat apparait si l'on pense à la difficulté que représente le titrage électrométrique d'un groupe anormal parmi les très nombreux groupes titrables d'une protéine.

L'étude de la courbe de variation de x_i ou y_t en fonction du pH permet de déterminer une valeur de pK. La valeur de cette constante d'ionisation apparente, K_i^*, comme le montre l'équation (1,8), a pour expression :

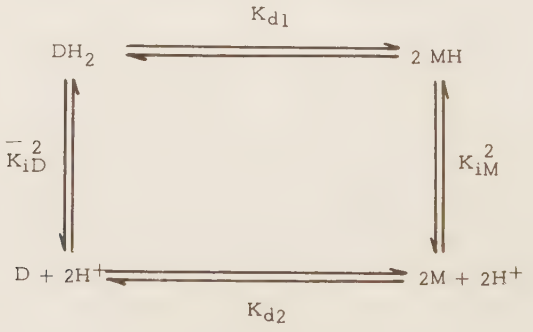
$$K_i^* = K_{i1} \frac{1 + K_{t1}}{1 + K_{t2}} = K_{i2} \frac{K_{t2}\,(1 + K_{t1})}{K_{t1}\,(1 + K_{t2})} \qquad (1,12)$$

Ces expressions de la constante d'ionisation apparente K_i^*, montrent que la transconformation de la molécule affecte seulement la valeur du pK et non l'allure de la courbe de titrage du groupe particulier aH, car cette courbe reste de la forme $1/(1+(H^+)/K)$. Nous montrerons plus loin qu'il en va différemment dans le cas d'une dimérisation.

Nous verrons dans une autre partie que l'étude du déplacement de l'équilibre de transconformation en fonction de la température à différents pH, peut permettre dans certaines conditions d'obtenir la valeur de x_t et d'évaluer K_{t1} et K_{t2}.

II.- DIMERISATION LIEE A UNE IONISATION

Supposons qu'une protéine puisse exister à l'état dimère et à l'état monomère et que la constante d'équilibre de dimérisation soit modifiée par le fait de l'ionisation d'un groupe particulier du protomère, de sorte que le dimère soit plus stable quand ce groupe est sous sa forme acide par exemple, et inversement, le monomère plus stable quand le groupe est sous sa forme basique. Nous pouvons représenter ces relations par le schéma d'équilibre suivant :



où $K_{iM} = \dfrac{(M)\,(H^+)}{(MH)}$ (2,1) $\qquad \bar{K}_{iD}^2 = \dfrac{(D)\,(H^+)^2}{(DH_2)}$ (2,2)

et $K_{d1} = \dfrac{(MH)^2}{(DH_2)}$ (2,3) $\qquad K_{d2} = \dfrac{(M)^2}{(D)}$ (2,4)

(MH) et (DH_2) représentent la concentration molaire des molécules, ayant le groupe particulier aH sous sa forme acide, à l'état monomère et à l'état dimère. (M) et (D) représentent la concentration molaire des molécules monomères et dimères ayant le groupe sous sa forme basique a.

D'après le schéma de cet équilibre, nous voyons qu'il y a deux chemins pour passer de l'état DH_2 à l'état M. Ces deux chemins, d'après les principes fondamentaux de la thermodynamique, sont nécessairement équivalents: en effet, on voit qu'il y a deux façons d'écrire la constante d'équilibre relative à l'équilibre global.

$$DH_2 \rightleftharpoons 2M + 2H^+$$

$$\frac{(M)^2\,(H^+)^2}{(DH_2)} = K_{d2} \cdot \bar{K}_{iD}^2 \qquad \text{ou encore} = K_{d1} \cdot K_{iM}^2$$

En conséquence, nous avons : $K_{d1}/K_{d2} = \bar{K}_{iD}^2/K_{iM}^2$ (2,5)

Donc, si K_{d1} est différent de K_{d2}, cette relation impose que $\bar{K}_{iD}^2$ soit différent de K_{iM}^2.

Remarques :

Dans cette étude nous supposerons que l'ionisation des deux groupes aH du dimère est un phénomène coopératif, c'est-à-dire que l'ionisation du groupe aH de l'un des deux protomères rend plus probable l'ionisation du groupe aH du second protomère, dans ces conditions la concentration (DH) de la forme intermédiaire est négligeable.

La constante $\bar{K}i_D^2$ est en fait égale au produit de deux constantes d'équilibre de valeurs très différentes.

A l'aide de ces relations nous nous proposons de montrer quelle serait la signification des constantes apparentes de dissociation acide-base et de dissociation moléculaire que l'on obtiendrait expérimentalement pour une protéine correspondant à ce modèle. Nous verrons ensuite comment il est possible de déterminer la valeur des quatre constantes intrinsèques de cet équilibre.

La fraction ionisée x_i du groupe aH et la fraction pondérale de protéine dissociée x_d sont susceptibles d'une détermination expérimentale :

$$x_i = \frac{(M) + 2\,(D)}{(M) + 2\,(D) + (MH) + 2\,(DH_2)} \quad (2,6), \qquad x_d = \frac{(M) + (MH)}{(M) + (MH) + 2\,(D) + 2\,(DH_2)} \quad (2,7)$$

En utilisant les équations (2,1) à (2,4) nous obtenons par substitution dans les équations (2,6) et (2, 7) :

$$x_i = \frac{1}{1 + \dfrac{(H^+)}{K_{iM}} \cdot \dfrac{1 + 2\,\dfrac{(MH)}{K_{d1}}}{1 + 2\,\dfrac{(M)}{K_{d2}}}} \quad (2,8) \qquad x_d = \frac{1}{1 + \dfrac{2(M)}{K_{d2}} \dfrac{1 + \dfrac{(H^+)^2}{\bar{K}_{iD}^2}}{1 + \dfrac{(H^+)}{\bar{K}_{iM}}}} \quad (2,9)$$

que l'on peut écrire :

$$x_i = \frac{1}{1 + \frac{(H^+)}{K_i^*}} \qquad \text{et} \qquad x_d = \frac{1}{1 + 2\,\frac{(M) + (MH)}{K_d^*}}$$

$$\text{en posant } K_i^* = K_{im}\,\frac{1 + 2\,\frac{(M)}{K_{d2}}}{1 + 2\,\frac{(MH)}{K_{d1}}} \quad \text{et} \quad K_d^* = K_{d2}\,\frac{(1 + \frac{(H^+)}{K_{iM}})^2}{1 + \frac{(H^+)^2}{K_{iD}^2}}$$

K_i^* et K_d^* sont les constantes apparentes de dissociation acide-base du groupe aH et de dissociation moléculaire de la protéine.

Ces expressions nous montrent :

- premièrement, que la valeur de la constante apparente de dissociation moléculaire K_d^* dépend de l'activité des ions hydrogène de la solution, en dehors de tout effet secondaire dû aux répulsions électrostatiques à grande distance qui sera envisagé plus loin.

- deuxièmement, que la constante apparente K_i^* est fonction du pH et de la concentration protéique de la solution du fait qu'elle dépend de la valeur des concentrations (M) et (MH). En conséquence, la courbe de titrage du groupe aH impliqué dans le mécanisme de dimérisation ne présente plus de centre de symétrie, car K_i^* varie avec le pH. De plus cette courbe de titrage subit une translation suivant l'axe des pH en fonction de la concentration protéique de la solution. C'est là une différence essentielle avec le modèle précédemment étudié où la transconformation associée à un groupe titrable n'affectait que le pK de ce groupe et non pas la forme de la courbe de titrage ; de plus la valeur du pK apparent était indépendante de la concentration de la solution protéique.

Etudions maintenant les expressions (2,8) et (2,9). Nous remarquerons tout d'abord qu'en faisant varier dans une zone suffisamment large l'activité des ions H^+, théoriquement entre ∞ et O, la valeur de x_i varie entre O et 1 et corrélativement x_d varie entre deux limites x_{d1} et x_{d2} :

x_{d1} est la valeur limite que prend x_d en milieu acide quand $(H^+) \to \infty$
x_{d2} est la valeur limite que prend x_d en milieu alcalin quand $(H^+) \to O$

$$x_{d1} = \frac{(MH)}{(MH) + 2(DH_2)} \qquad \frac{1}{1 + 2\,\frac{(MH)}{K_{d1}}} \qquad (2,10)$$

$$x_{d2} = \frac{(M)}{(M) + 2(D)} = \frac{1}{1 + 2\,\frac{(M)}{K_{d2}}}$$

Les valeurs de x_d, x_{d1} et x_{d2} peuvent être obtenues expérimentalement à partir de techniques donnant la masse moléculaire moyenne en poids ; en effet il est facile de démontrer que la fraction pondérale de protéine dissociée x_d est égale à :

$$x_d = 1 - \frac{\overline{M}_w - M}{M} \qquad (2,11)$$

où M est la masse moléculaire du monomère et M_w la masse moléculaire moyenne en poids.

Bien que nous puissions connaître expérimentalement la variation de x_d en fonction du pH, nous allons montrer qu'il est intéressant de connaître l'expression donnant la variation relative de x_d entre ses limites x_{d1} et x_{d2}, que nous appellerons taux de conversion apparent y_d :

$$y_d = \frac{x_d - x_{d1}}{x_{d2} - x_{d1}}$$

en utilisant les équations (2,9) et (2,10), nous trouvons :

$$\boxed{y_d = x_i}$$

La courbe de variation du taux de conversion apparent y_d en fonction du pH est toujours et en tout point identique à la courbe de titrage du groupe aH impliqué dans le phénomène de dimérisation.

L'intérêt pratique de ce résultat est de montrer qu'il est possible, par l'étude des variations de la masse molaire moyenne en fonction du pH, à une concentration donnée, d'obtenir à la fois la courbe de variation de x_d et de x_i.

Nous allons voir maintenant comment, à partir de ces données, on peut obtenir la valeur des différentes constantes d'équilibre K_{d1}, K_{d2}, K_{iM} et K_{iD}.

Reprenons l'équation (9) exprimant x_d en fonction de (M), il est préférable d'introduire à la place de la concentration partielle (M), la concentration protéique globale C exprimée en nombre d'unités protomères et monomères par unité de volume :

$C = 2(DH_2) + 2(D) + (MH) + (M)$, par substitution en utilisant les équations (2,1) à (2,4), cette égalité peut se mettre sous la forme d'une équation du second degré :

$$a\,(M)^2 + b\,(M) - C = 0 \qquad (2,12)$$

$$\text{où } a = \frac{2}{K_{d2}}\left(1 + \frac{(H^+)^2}{K_{iD}}\right) \quad \text{et} \quad b = \left(1 + \frac{(H^+)}{K_{iM}}\right)$$

De cette équation (2,10) on tire la valeur de (M) en fonction de la concentration protéique globale C et on l'introduit dans l'équation (2,9), qui devient :

$$x_d = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{b^2 + 4\,a\,C}{b}}} \qquad (2,13)$$

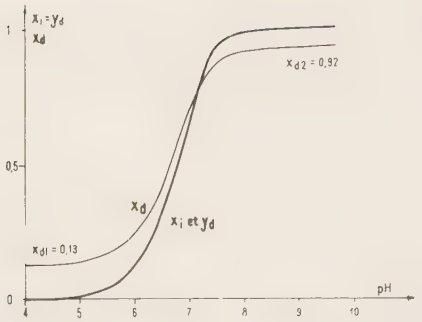


Fig. 10a - Courbes théoriques de variations de x_d et de x_i en fonction du pH ($x_i = y_d$) quand par exemple :

$K_{iM} = 10^{-6}$, $K_{d1} = 10^{-6}M$,

$K_{d2} = 10^{-3}M$ et $C = 2\ 10^{-4}M$.

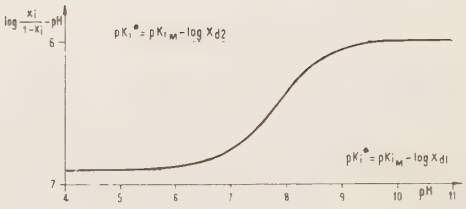


Fig. 10b - Courbe théorique de variation de la constante apparente de dissociation, K_{iM}, en fonction du pH.

mais il est préférable de transformer cette relation et de l'utiliser sous la forme suivante :

$$\frac{x_d^2}{1 - x_d} = \frac{K_{d2}}{2C} \frac{(1 + \frac{(H^+)}{K_{iM}})^2}{1 + \frac{(H^+)^2}{K_{iD}^2}} = \frac{K_d^*}{2C} \qquad (2,14)$$

ou sous la forme logarithmique :

$$\log \frac{x_d^2}{1 - x_d} + \log (2C) = \log K_d^* \qquad (2,15)$$

La valeur de $\log x_d^2/(1-x_d) + \log (2.C)$ en fonction de $\log C$ est une constante égale à $\log K_d^*$ dont la valeur ne dépend que du pH.

La variation de $\log (x_d^2/(1-x_d) + \log (2C)$ en fonction du pH est représentée par une courbe sigmoïde qui tend asymptotiquement vers $\log K_{d1}$ en milieu acide et $\log K_{d2}$ en milieu alcalin avec

$$K_{d1} = 2C \frac{x_{d1}^2}{1 - x_{d1}} \qquad (2,16) \qquad \text{et} \qquad K_{d2} = 2C \frac{x_{d2}^2}{1 - x_{d2}} \qquad (2,17)$$

De la même manière on peut, à partir des résultats expérimentaux donnant la valeur de x_i ou de y_d en fonction du pH à une concentration C donnée, étudier la variation de la constante apparente de dissociation acide-base, K_i :

La sigmoïde représentant les variations de pK_i^* en fonction du pH a pour équation :

$$pK_i^* = \log \frac{x_i}{1 - x_i} - pH \qquad (2,18)$$

les deux asymptotes horizontales de cette courbe ont pour ordonnée :

en milieu acide $\quad pK_i^* = pK_{iM} - \log x_{d1} \qquad (2,19)$

et en milieu alcalin $\quad pK_i^* = pK_{iM} + \log x_{d2} \qquad (2,20)$

Expressions d'où l'on tire la valeur de K_{iM}.

Les valeurs de K_{d1}, K_{d2} et K_{iM} étant connues la valeur de la quatrième constante d'équilibre est déterminée à partir de la relation (2,5) :

$$\bar{K}_{iD}^2 = K_{iM}^2 \frac{K_{d1}}{K_{d2}} \qquad (2,21)$$

En conclusion, nous pouvons dire qu'une dimérisation associée à l'ionisation d'un groupe titrable, modifie la forme de la courbe de titrage de ce groupe : *la constante d'ionisation est multipliée par un coefficient dont la valeur est fonction du* pH *et de la concentration protéique.*

Dans l'étude du modèle ci-dessus envisagé, nous avons délibérément écarté l'effet non spécifique des interactions électrostatiques à grandes distances, pour mieux mettre en évidence le rôle que peut jouer un groupe particulier dans le mécanisme d'une dimérisation. Cependant, les protéines étant des polyélectrolytes nous devons dans tous les cas tenir compte de la variation d'enthalpie libre de répulsion électrostatique $\Delta(\Delta G_e)$, en introduisant une constante d'interaction électrostatique K_e, laquelle nous permet, connaissant la valeur de la constante expérimentale de dissociation moléculaire K_d^{**} de calculer la valeur de K_d^* :

$$K_d^* = K_d^{**} K_e$$

La valeur de K_e est égale à exp. $-\Delta(\Delta G_e)/RT$. Pour une protéine de charge électrique moyenne $\bar{Z}$, la valeur de $\Delta(\Delta G_e)$ est proportionnelle à $\bar{Z}^2$ selon la théorie approchée de Linderstrøm-Lang. A partir de la courbe de titrage de la protéine il est donc théoriquement possible d'obtenir la courbe de variation de Ke en fonction du pH, ce qui doit nous permettre de calculer la variation de la constante apparente K_d^*.

De plus, il y a également lieu de tenir compte de l'effet des interactions électrostatiques sur la dissociation de l'ion H^+ du groupe aH impliqué dans le mécanisme de dimérisation :

$$K_{iM} = K_{iM\ int.} \cdot \exp.\ 2w\bar{Z} \text{ et } K_{iD} = K_{iD\ int.} \cdot \exp.\ 2w'\bar{Z}' \qquad (2,22)$$

exp. $2w\bar{Z}$ est un coefficient d'interaction électrostatique dans lequel w est le paramètre de Linderstrøm-Lang qui, dans un système aqueux à 25° C, ne dépend que de la force ionique du milieu et de la forme et dimension de la molécule protéique, les charges étant supposées uniformément réparties à la surface de la molécule.

Dans le développement théorique qui précède nous avons supposé que les interactions électrostatiques étaient nulles, les constantes d'ionisations utilisées étaient donc des constantes d'ionisations intrinsèques. Ce sont ces constantes intrinsèques d'ionisation qui devront être utilisées dans le cas d'une étude expérimentale.

DISCUSSION

Le modèle de dimérisation symétrique associée à l'ionisation d'un groupe particulier sur chaque protomère tel que nous venons de l'étudier, s'applique particulièrement bien au cas d'une protéine où l'association entre protomères se ferait par interaction entre deux régions hydrophobes homologues portant chacune le même groupe ionisable. En effet dans ce cas particulier, on comprend aisément que le groupe ionisable enfoui, dans le dimère, au sein de la région de contact hydrophobe et de basse constante diélectrique, n'ait pas la même valeur de constante d'ionisation que lorsque ce groupe, sur le monomère, se trouve au contact du solvant aqueux.

Remarquons cependant que l'abaissement de la constante diélectrique et de la polarité du milieu doivent avoir des effets différents suivant la nature du groupe considéré ; en effet, nous savons que :

- Dans un milieu de constante diélectrique faible, la constante de dissociation du proton de tous les groupes ionisables doit être abaissée.

- Dans un milieu hydrophobe ou peu polaire, l'équilibre de dissociation acide-base sera déplacé vers la forme non chargée du groupe ionisable, c'est-à-dire la moins polaire.

Lorsque le proton appartient aux groupes dont la forme dissociée correspond à la forme la moins polaire, c'est-à-dire les groupes COOH, -SH et -OH, on peut prévoir que l'abaissement de la constante diélectrique et de la polarité du milieu doivent avoir des effets synergiques sur la dissociation de ce proton. Par contre dans les mêmes conditions, il doit exister des effets antagonistes sur la dissociation du proton fixé sur un atome d'azote, imidazole, amine et guanidine, car dans ce cas la forme non dissociée correspond à la forme chargée, la plus polaire.

Il est intéressant de remarquer que dans la plupart des cas connus, les groupes possédant des pK anormaux, dans les protéines, sont précisément des groupes COOH, SH ou OH (tyr).

Il est logique de penser que l'association entre monomères sera grandement facilitée lorsque le groupe ionisable, COOH par exemple, se trouvant sur l'aire de contact hydrophobe ne portera pas de charge, car l'énergie électrostatique que doit vaincre la molécule pour maintenir un groupe chargé enfoui dans une région hydrophobe est considérable (6). Nous pouvons également dire corrélativement à ceci que la région hydrophobe de jonction dans le dimère favorise le maintien à l'état non chargé des groupes titrables incorporés dans cette région, ce qui peut permettre d'expliquer une augmentation considérable du pK d'ionisation par rapport au pK normal qui serait celui du groupe sur le monomère.

Dans le cas d'une dimérisation favorisée par abaissement de la valeur du pH, le groupe mis en cause dans le mécanisme de réaction ne peut être qu'un groupe COOH, SH ou OH car se sont les seuls groupes titrables dont on neutralise la charge en abaissant le pH d'une solution protéique.

Ce groupe doit avoir un pK anormalement élevé qui varie avec la valeur du

pH dans la zone de pH de dimérisation et aussi avec la concentration de la solution protéique, équ. (2, 18) à 2,20).

Enfin, il n'est pas impossible, que si les COOH se trouvent au centre de la surface de contact, qu'il existe une double liaison hydrogène symétrique carboxyle-carboxyle par laquelle passerait l'axe de symétrie du dimère.

III.- TRANSCONFORMATION ET DIMERISATION LIEES A UNE IONISATION

Supposons comme précédemment qu'une protéine puisse exister à l'état dimère et à l'état monomère et que la constante d'équilibre de dimérisation soit modifiée par le fait de l'ionisation d'un groupe particulier de la molécule ; mais supposons de plus que la dissociation du dimère rende plus probable un réarrangement réversible de la structure secondaire ou tertiaire de la molécule.

Nous avons alors trois phénomènes de natures différentes, une transconformation, une dimérisation et une ionisation, qui sont interdépendants ; donc toute perturbation d'un phénomène doit se répercuter sur les autres.

A.- INTERACTIONS SYMETRIQUES ENTRE LES PROTOMERES

Nous représenterons respectivement par (MH) et (DH_2) les concentrations moléculaires des monomères et dimères ayant le groupe particulier aH sous sa forme acide et par (M) et (D) la concentration des monomères et dimères ayant le groupe sous sa forme basique α, comme nous l'avons fait plus haut dans le cas d'une dimérisation liée à une ionisation. De plus, il y a lieu de tenir compte ici, des concentrations (M'H), ($D''H_2$), (M') et (D'') des monomères et dimères ayant subi la transconformation réversible.

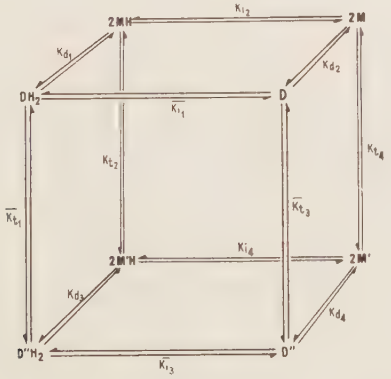


Fig. 11 - Diagramme d'équilibre dans le cas d'une dimérisation associée à une transconformation et à la fixation spécifique d'un proton *(intéractions symétriques entre protomères)*.

Nous supposerons d'abord qu'il existe de fortes interactions symétriques entre protomères, c'est-à-dire que, dans le cas du dimère, l'ionisation du groupe particulier d'un protomère facilite considérablement l'ionisation du groupe homologue sur l'autre protomère ; de même conformément aux idées de J. Monod et de ses collaborateurs, nous pouvons supposer que la transconformation d'un protomère entraîne de façon symétrique la transconformation du protomère, de sorte que la probabilité d'existence des états intermédiaires soit très faible et pratiquement négligeable.

Nous aurons donc à étudier les variations de concentration de huit espèces moléculaires, reliées entre elles par douze constantes d'équilibre (voir figure 11, le schéma d'équilibre).

Dimérisation	*Transconformation*	*Ionisation*
$K_{d1} = (MH)^2/(DH_2)$	$\bar{K}_{t1}^2 = (D''H_2)/(DH_2)$	$\bar{K}_{i1}^2 = (D)(H^+)^2/(DH_2)$
$K_{d2} = (M)^2/(D)$	$K_{t2} = (M'H)/(MH)$	$K_{i2} = (M)(H^+)/(MH)$
$K_{d3} = (M'H)^2/(D''H_2)$	$\bar{K}_{t3}^2 = (D'')/(D)$	$\bar{K}_{i3}^2 = (D'')(H^+)^2/(D''H_2)$
$K_{d4} = (M')^2/(D'')$	$K_{t4} = (M')/(M)$	$K_{i4} = (M')(H^+)/(M'H)$

($\bar{K}_{t1}$, $\bar{K}_{t3}$, $\bar{K}_{i1}$ et $\bar{K}_{i3}$ sont des constantes moyennes géométriques d'équilibres considérés comme coopératifs ; chacune de ces constantes est donc en fait la racine carrée d'un produit de deux constantes de valeurs différentes).

Toutes ces constantes d'équilibre sont reliées entre elles par un grand nombre de relations, ce qui réduit à 7 le nombre de constantes indépendantes. Nous ne donnerons ci-dessous que les relations dont nous aurons besoin dans la suite de cet exposé :

En remarquant qu'il existe plusieurs façons d'écrire la constante d'équilibre relative à la réactions $DH_2 \rightleftharpoons 2M'H$ par exemple, nous obtenons :

$$(3,1)\quad \frac{(M'H)^2}{(DH_2)} = \bar{K}_{t1}^2 \cdot K_{d3} = K_{d1} \cdot K_{t2}^2 = \text{etc...} \qquad \text{et donc} \quad \frac{K_{d1}}{K_{d3}} = \frac{\bar{K}_{t1}^2}{K_{t2}^2}$$

De la même manière :

$$(3,2)\quad \frac{(M')^2}{(D)} = \bar{K}_{t3}^2 \cdot K_{d4} = K_{d2} \cdot K_{t4}^2 \qquad \text{d'où} \qquad \frac{K_{d2}}{K_{d4}} = \frac{\bar{K}_{t3}^2}{K_{t4}}$$

$$(3,3)\quad \frac{(M)^2}{(DH_2)} = \bar{K}_{i1}^2 \cdot K_{d2} = K_{d1} \cdot K_{i2}^2 \qquad \text{d'où} \qquad \frac{K_{d1}}{K_{d2}} = \frac{\bar{K}_{i1}^2}{K_{i2}^2}$$

$$(3,4)\quad \frac{(M')^2}{(D''H_2)} = \bar{K}_{i3}^2 \cdot K_{d4} = K_{d3} \cdot K_{i4}^2 \qquad \text{d'où} \qquad \frac{K_{d3}}{K_{d4}} = \frac{\bar{K}_{i3}^2}{K_{i4}^2}$$

$$(3,5)\quad \frac{(M')(H^+)}{(MH)} = K_{i2} \cdot K_{t1} = K_{t2} \cdot K_{i4} \qquad \text{d'où} \qquad \frac{K_{t2}}{K_{t4}} = \frac{K_{i2}}{K_{i4}}$$

Nous allons essayer de voir s'il est possible, à partir des données expérimentales que l'on peut espérer obtenir par les techniques physiques classiques d'étudier le mécanisme de réaction correspondant au modèle proposé, c'est-à-dire de calculer les différentes constantes d'équilibre à partir de résultats expérimentaux donnant la fraction ionisée x_i du groupe aH, la fraction de molécules transformées x_t et la fraction de molécules dissociées x_d en fonction du pH et de la concentration totale de la solution protéique.

$$x_i = \frac{(M) + 2(D) + (M') + 2(D'')}{(M) + 2(D) + (M') + 2(D'') + (MH) + 2(DH_2) + (M'H) + 2(D''H_2)}$$

$$x_t = \frac{2(D'') + (M') + 2(D''H_2) + (M'H)}{2(D'') + (M') + 2(D''H_2) + (M'H) + 2(D) + (M) + 2(DH_2) + (MH)}$$

$$x_d = \frac{(M) + (MH) + (M') + (M'H)}{(M) + (MH) + (M') + (M'H) + 2[(D) + (DH_2) + (D'') + (D''H_2)]}$$

Nous exprimerons x_i, x_t et x_d en fonction des différentes constantes d'équilibre que nous pourrons substituer à la valeur des concentrations.

Nous obtenons alors :

$$(3,6)\quad x_i = \frac{1}{1 + \frac{(H^+)}{K_{i2}} \frac{1 + K_{t2}}{1 + K_{t4}} \frac{1 + 2\frac{(MH)}{K_{d1}} (1 + \bar{K}_{t1}^2)(1 + K_{t2})^{-1}}{1 + 2\frac{(M)}{K_{d2}} (1 + \bar{K}_{t3}^2)(1 + K_{t4})^{-1}}}$$

$$(3,7)\quad x_5 = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_{t4}} \frac{1 + \frac{(H^+)}{K_{i2}}}{1 + \frac{(H^+)}{K_{i4}}} \frac{1 + 2\frac{(M)}{K_{d2}} (1 + 2\frac{(H^+)^2}{\bar{K}_{i1}^2})(1 + \frac{(H^+)}{K_{i2}})^{-1}}{1 + 2\frac{(M')}{K_{d4}} (1 + 2\frac{(H^+)^2}{\bar{K}_{i3}^2})(1 + \frac{(H^+)}{K_{i4}})^{-1}}}$$

$$(3,8)\quad x_d = \frac{1}{1 + 2\frac{(MH)+(M)+(M'H)+(M')}{K_{d2}} \frac{1 + \bar{K}_{t3}^2}{(1 + K_{t4})^2} \frac{1 + \frac{(H^+)^2}{\bar{K}_{i1}^2} (1 + \bar{K}_{t1}^2)(1 + \bar{K}_{t3}^2)^{-1}}{[1 + \frac{(H^+)}{K_{i2}} (1 + K_{t2})(1 + K_{t4})^{-1}]^2}}$$

Que nous écrirons plus simplement :

$$(3,9)\quad x_i = \frac{1}{1 + \dfrac{(H^+)}{K_i^*}}, \qquad x_t = \frac{1}{1 + \dfrac{1}{K_t^*}}, \qquad \text{et } x_d = \frac{1}{1 + 2\,\dfrac{(\text{monomères})}{K_d^*}}$$

où K_i^*, K_t^* et K_d^* sont des constantes apparentes.

Les expressions de x_i, x_t et x_d montrent que la fraction de molécule ayant le groupe particulier aH sous sa forme basique, la fraction de molécule transformée ainsi que la fraction de molécule à l'état monomère, ont une valeur qui est fonction du pH et de la concentration protéique de la solution.

Remarquons également qu'en fonction de l'activité des ions (H^+), x_i varie de 0 à 1 tandis que corrélativement x_t varie entre deux valeurs limites que nous appellerons x_{t1} et x_{t2}, il en est de même pour x_d qui varie dans les mêmes conditions de x_{d1} à x_{d2}. Mais s'il est expérimentalement aisé de connaître les différentes valeurs de x_d, il ne semble pas facile de connaître x_{t1} et x_{t2} car généralement nous ne connaissons pas la valeur de x_t, nous ne pouvons atteindre qu'un degré de conversion apparent y_t entre x_{t1} et x_{t2}.

$$y_t = \frac{x_t - x_{t1}}{x_{t2} - x_{t1}}$$

Cependant nous pouvons calculer la valeur théorique de x_{t1} et x_{t2} que nous tirons de l'expression de x_t en prenant $(H^+) = \infty$ et $(H^+) = 0$.

$$(3,10)\quad x_{t1} = \frac{1}{1 + \dfrac{1}{K_{t2}}\,\dfrac{1 + 2\,\dfrac{(MH)}{K_{d1}}}{1 + 2\,\dfrac{(M'H)}{K_{d3}}}} \qquad x_{t2} = \frac{1}{1 + \dfrac{1}{K_{t4}}\,\dfrac{1 + 2\,\dfrac{(M)}{K_{d2}}}{1 + 2\,\dfrac{(M')}{K_{d4}}}}$$

Nous pouvons donc calculer l'expression donnant la valeur de la grandeur expérimentale y_t.

Nous pouvons de la même manière déterminer la valeur de x_{d1} et x_{d2} :

$$(3,11)\qquad x_{d1} = \frac{1}{1 + 2\,\dfrac{(MH) + (M'H)}{K_{d1}}\,\dfrac{1 + \overline{K}_{t1}^2}{(1 + K_{t2})^2}}$$

$$(3,11)\qquad x_{d2} = \frac{1}{1 + 2\,\dfrac{(M) + (M')}{K_{d2}}\,\dfrac{1 + \overline{K}_{t3}^2}{(1 + K_{t4})^2}}$$

et calculer le degré de conversion apparent y_d entre x_{d1} et x_{d2} :

$$y_d = \frac{x_d - x_{d1}}{x_{d2} - x_{d1}}$$

Le calcul de y_t et y_d bien que très long ne présente pas de difficultés, nous ne donnerons donc que le résultat essentiel, à savoir : $\boxed{y_t = y_d = x_i}$

Ce résultat montre que la variation du taux de transconformation apparent y_t et la variation du taux de conversion y_d en fonction du pH sont représentées par une courbe identique à la courbe de titrage du groupe aH de la protéine impliqué dans ce phénomène (voir exemple figure 12a).

Nous allons à présent déterminer la valeur des 12 constantes d'équilibre en suivant le même processus que dans l'étude du modèle précédent.

La concentration moléculaire globale, exprimée en nombres de monomères de protomères par unité de volume, est égale à :

$$C = 2[(DH_2) + (D"H_2) + (D) + (D")] + (MH) + (M'H) + (M) + (M')$$

On peut mettre cette expression sous la forme d'une équation du second degré après avoir exprimé les concentrations partielles en fonction des constantes d'équilibre du système. On obtient alors :

(3,12) $$a\,(M)^2 + b\,(M) + C = 0$$

$$\text{où } a = \frac{2}{\bar{K}_{d2}}\left[1 + \frac{(H^+)^2}{K_{i2}} + \bar{K}_{t3}^{\,2}\left(1 + \frac{(H^+)^2}{\bar{K}_{i3}^{\,2}}\right)\right]$$

$$\text{et } b = 1 + \frac{(H^+)}{K_{i2}} + K_{t4}\left(1 + \frac{(H^+)}{K_{i4}}\right)$$

1.- CONSTANTES DE DISSOCIATION MOLECULAIRE

L'équation (3,12) permet d'exprimer (M) en fonction de la concentration globale C et d'obtenir à partir de l'expression de x_d la relation suivante :

(3,13) $$\log \frac{x_d^2}{1 - x_d} + \log (2\,C) = \log K_d^*$$

La valeur de la constante apparente de dissociation K_d^* comme le montre l'équation (3,8) ne dépend que de l'activité des ions hydrogène de la solution. La courbe de variation de $\log K_d^*$ en fonction du pH est une courbe sigmoïde qui a pour asymptotes deux droites dont les ordonnées sont :

(3,14) en milieu acide $$\log K_{d1}\,\frac{(1 + K_{t2})^2}{1 + \bar{K}_{t1}^{\,2}} = \log \frac{x^2_{d1}}{1 - x_{d1}} + \log (2\,C)$$

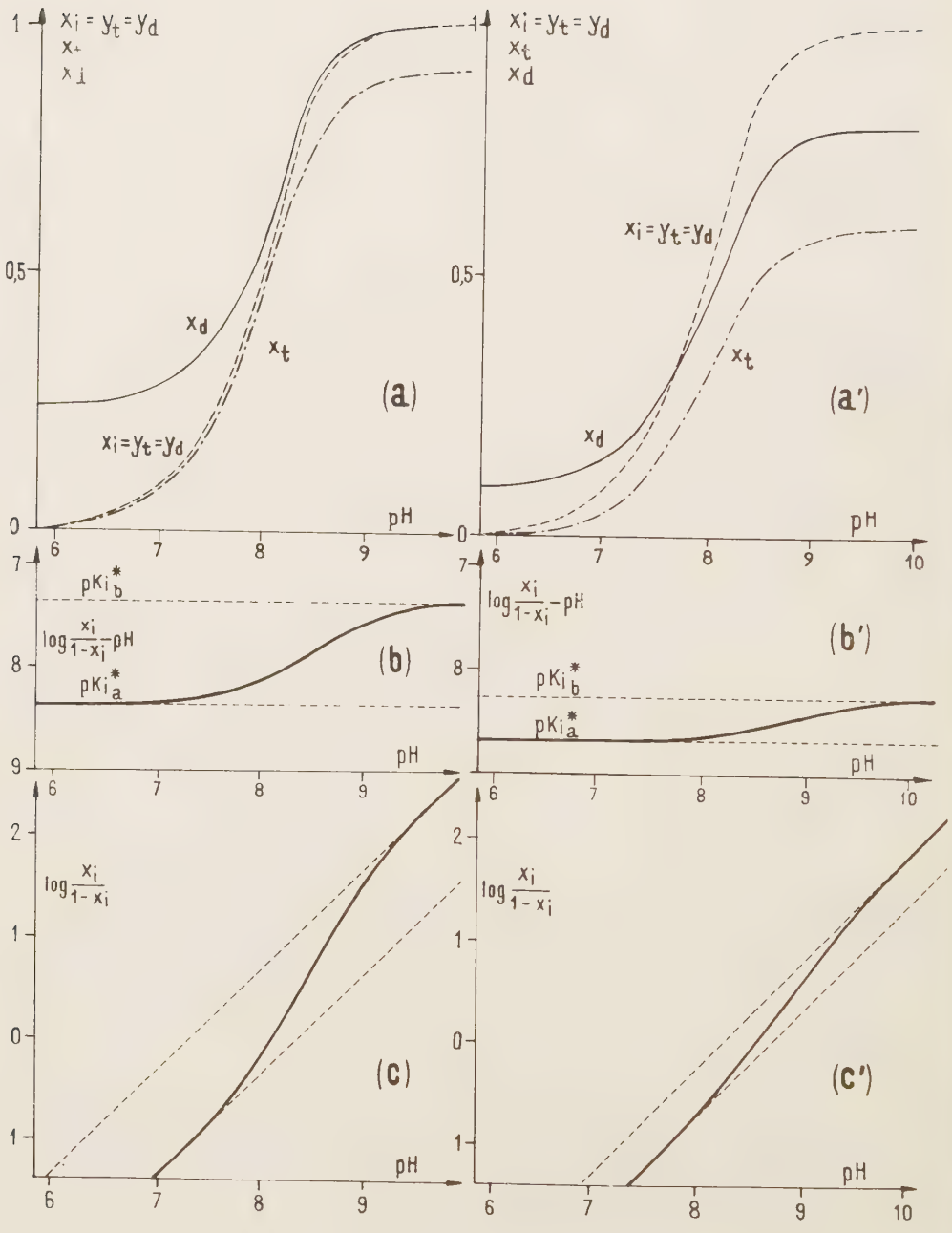

$x_i = y_t = y_d$
x_t
x_d
x_d
x_t
$x_i = y_t = y_d$
(a)
pH
$x_i = y_t = y_d$
x_t
x_d
$x_i = y_t = y_d$
x_t
(a')
pH
$pK_i^*_b$
$\log \frac{x_i}{1-x_i} - pH$
$pK_i^*_a$
(b)
pH
$\log \frac{x_i}{1-x_i} - pH$
(b')
$pK_i^*_b$
$pK_i^*_a$
pH
$\log \frac{x_i}{1-x_i}$
(c)
pH
$\log \frac{x_i}{1-x_i}$
(c')
pH

Fig. 12 - Variation de x_d, x_t et x_i en fonction du pH ($x_i = y_d = y_t$). Les exemples sont donnés pour les valeurs particulières suivantes :

a, b, et c : $C = 10^{-4}M$. $K_{d1} = 0,2\ 10^{-4}M$, $K_{d2} = 0,2$
$pK_{i2} = 8,4$ $\overline{K}_{t3} = 100$, $K_{t4} = 1$
$\overline{K}_{t1}$ et K_{t2} plus petits que 1.

a', b', et c' : $C = 10^{-4}M$, $K_{d1} = 0,2\ 10^{-4}M$ $K_{d2} = 0,2\ 10^{-3}M$,
$pK_{i2} = 8,7$, $\overline{K}_{t3} = 10$, $K_{t4} = 1$
$\overline{K}_{t1}$ et K_{t2} plus petits que 1.

12b et 12b' - Variation de pK_i^* en fonction du pH.

12c et 12c' - Représentation de Hill : Variation de $\log \frac{x_i}{1 - x_i}$ en fonction du pH.

(3,14) et en milieu basique $$\log K_{d2} \frac{(1 + K_{t4})^2}{1 + \overline{K}_{t3}^2} = \log \frac{x^2_{d2}}{1 - x_{d2}} + \log (2\,C)$$

Connaissant la valeur des constantes d'équilibre de transconformation, nous pourrions déterminer la valeur de K_{d1} et K_{d2}, puis à partir de celles-ci et d'après les relations (3,1) et (3,2), la valeur de K_{d3} et K_{d4} :

$$K_{d3} = K_{d1} \frac{K_{t2}^2}{\overline{K}_{t1}^2} \qquad K_{d4} = K_{d2} \frac{K_{t4}^2}{\overline{K}_{t3}^2}$$

2.- CONSTANTES D'IONISATION

Pour obtenir la valeur des constantes d'équilibre de dissociation acide-base du groupe aH de la protéine dans ses différentes conformations tertiaires et quaternaires, nous avons la possibilité d'utiliser trois grandeurs expérimentales différentes, mais ayant la même expression théorique : x_i, y_t et y_d.

La variation de $\log (x_i/(i - x_i)) - pH$ en fonction du pH est une courbe sigmoïde (voir fig. 12b).

(3,15) $$pK_i^* = \log \frac{x_i}{1 - x_i} - pH$$

cette courbe admet deux asymptotes horizontales qui ont pour ordonnées :

- En milieu acide $$pK_i^*_{acide} = pK_{i2} - \log \frac{1 + K_{t4}}{1 + K_{t2}} - \log x_{d1}$$

(3,16)

- En milieu basique $$pK_i^*_{basique} = pK_{i2} - \log \frac{1 + K_{t4}}{1 + K_{t2}} + \log x_{d2}$$

Nous pouvons donc de deux façons différentes obtenir $K_{i2}(1+K_{t4})\ (1+K_{t2})^{-1}$; remarquons cependant qu'aux fortes dilutions x_d tendant vers 1, les deux asymptotes se rapprochent et tendent à se confondre.

D'après les relations (3,3), (3,4) et (3,5) nous pouvons écrire :

$$\bar{K}_{i1}^{2} = K_{i2}^{2}\,\frac{K_{d1}}{K_{d2}} \quad , \quad K_{i4} = K_{i2}\,\frac{K_{t4}}{K_{t2}} \quad , \quad \bar{K}_{i3}^{3} = K_{i4}^{2}\,\frac{K_{d3}}{K_{d4}}$$

Il suffit à présent de déterminer la valeur des constantes d'équilibre de transconformation pour que toutes les constantes d'équilibre du système soient connues.

3.- CONSTANTES DE TRANSCONFORMATION

Bien que l'on ne puisse pas, comme nous l'avons déjà dit, mesurer directement la valeur réelle de la fraction x_t de molécule transformée réversiblement, supposons que par quelque artifice expérimental nous puissions obtenir indirectement cette valeur.

Les expressions (3,7) et (3,9) montrent que la constante apparente de transconformation K_t^* est égale à :

$$K_t^* = \frac{x_t}{1 + x_t} \tag{3,17}$$

et que cette valeur dépend de l'activité des ions H^+ et de la concentration protéique de la solution.

Quand on fait varier l'activité des ions hydrogène, K_t^* varie entre deux limites qui ont pour valeur en combinant les équations (3,10) et (3,11) :

En milieu acide :

$$\frac{x_{t1}}{1 - x_{t1}} = K_{t2}\ \frac{1 + \dfrac{1 - x_{d1}}{x_{d1}}\ \dfrac{\bar{K}_{t1}^{2}\,(1 + K_{t2})}{K_{t2}\,(1 + \bar{K}_{t1}^{2})}}{1 + \dfrac{1 - x_{d1}}{x_{d1}}\ \dfrac{1 + K_{t2}}{1 + \bar{K}_{t1}^{2}}} \tag{3,18}$$

En milieu alcalin :

$$\frac{x_{t2}}{1 - x_{t2}} = K_{t4}\ \frac{1 + \dfrac{1 - x_{d2}}{x_{d2}}\ \dfrac{\bar{K}_{t3}^{2}\,(1 + K_{t4})}{K_{t4}\,(1 + \bar{K}_{t3}^{2})}}{1 + \dfrac{1 - x_{d2}}{x_{d2}}\ \dfrac{1 + K_{t4}}{1 + \bar{K}_{t3}^{2}}} \tag{3,19}$$

Sachant qu'en fonction de la concentration protéique la valeur de $(1 - x_d)/x_d$ varie de 0 à ∞, ces expressions nous montrent que corrélativement $x_{t1}/(1 - x_{t1})$ varie de K_{t2} à K_{t1}^2.

(3,20) et $x_{t2}/(1 - x_{t2})$ varie de K_{t4} à $\overline{K}_{t3}^2$

B.- ABSENCE D'INTERACTION SYMETRIQUE ENTRE LES PROTOMERES

Jusqu'à présent nous avons supposé que, dans le dimère, l'ionisation des deux groupes particuliers homologues de même que la transconformation des deux protomères étaient des phénomènes coopératifs ce qui nous donnait le droit de négliger les étapes intermédiaires, droit d'autant plus légitime que ces phénomènes coopératifs correspondent généralement à la réalité des faits. Cependant, on peut se demander ce que deviendraient les relations établies précédemment dans le cas de phénomènes non coopératifs.

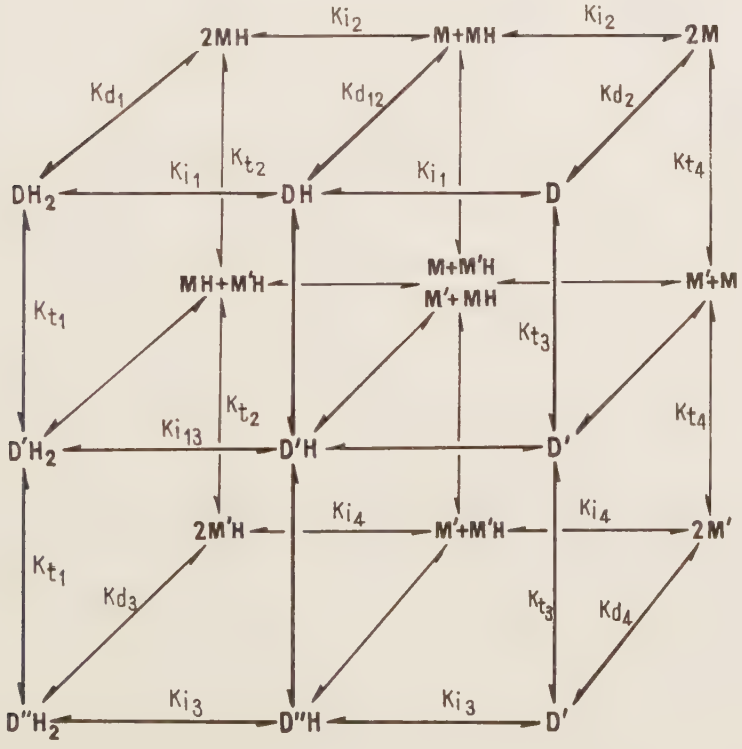


Fig. 13 - Diagramme d'équilibre dans le cas d'une dimérisation associée à une transconformation et la fixation spécifique d'un proton *(absence d'interaction symétrique entre protomères).*

Remarquons qu'en distinguant dans le dimère la position des deux protomères, il y a deux façons d'obtenir les formes intermédiaires D', $D'H_2$, DH et D"H que l'on pourrait représenter par les symboles D' et 'D, HD'H et H'DH, HD et DH, 'D'H et H'D'. Il existe de même quatre façons d'obtenir D'H : $D'H_4$, HD', 'DH et H'D (figure 13). En tenant compte de toutes ces formes les expressions de x_i, x_t et x_d deviennent alors :

$$x_i = \frac{(M) + (M') + 2\,(D) + 2\,(D') + (D'') + (DH) + 2\,(D'H) + (D''H)}{\text{Concentration moléculaire totale : C}}$$

$$x_t = \frac{(M') + (M'H) + 2\,(D') + 2\,(D'H) + (D'H_2) + (D'') + 2\,(D''H) + (D''H_2)}{C}$$

$$x_d = \frac{(M) + (M') + (MH) + (M'H)}{C}$$

En exprimant x_i, x_t et x_d en fonction de la valeur des constantes intrinsèques des différents équilibres nous obtenons :

$$(3,6bis)\quad x_i = \frac{1}{1 + \frac{(H^+)}{K_{i2}} \; \frac{(1 + K_{t2}) + 2\,\frac{(MH)}{K_{d1}}\,(1 + K_{t1})^2 + 2\,\frac{(M)}{K_{d12}}\,(1 + K_{t13})^2}{(1 + K_{t4}) + 2\,\frac{(M)}{K_{d2}}\,(1 + K_{t3})^2 + 2\,\frac{(MH)}{K_{d12}}\,(1 + K_{t13})^2}}$$

$$(3,7bis)\quad x_t = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_{t4}} \; \frac{(1 + \frac{(H^+)}{K_{i2}}) + 2\,\frac{(M')}{K_{d24}}\,(1 + \frac{(H^+)}{K_{i13}})^2 + 2\,\frac{(M)}{K_{d2}}\,(1 + \frac{(H^+)}{K_{i1}})^2}{(1 + \frac{(H^+)}{K_{i4}}) + 2\,\frac{(M)}{K_{d24}}\,(1 + \frac{(H^+)}{K_{i13}})^2 + 2\,\frac{(M')}{K_{d4}}\,(1 + \frac{(H^+)}{K_{i3}})^2}}$$

$$(3,8bis)\quad x_d = \frac{1}{1 + 2\,\frac{(\text{monomères})}{K_{d2}} \; \frac{(1 + \frac{(H^+)}{K_{i1}})^2 + 2K_{t3}\,(1 + \frac{(H^+)}{K_{i13}})^2 + K_{t3}^2\,(1 + \frac{(H^+)}{K_{i3}})^2}{\left[(1 + \frac{(H^+)}{K_{i2}}) + K_{t4}\,(1 + \frac{(H^+)}{K_{i4}})\right]^2}}$$

Dans ces équations nous avons utilisé pour les constantes d'équilibre les mêmes symboles que dans les formules précédentes, cependant ici les constantes K_{t1} et K_{t3}, K_{i1} et K_{i3} sont des constantes intrinsèques et non plus des constantes moyennes de phénomènes coopératifs. D'autre part, pour alléger l'écriture nous avons employé K_{t13} pour $\sqrt{K_{t1} \cdot K_{t3}}$.

K_{d12} pour $\sqrt{K_{d1} \cdot K_{d2}}$, K_{d24} pour $\sqrt{K_{d2} \cdot K_{d4}}$ et

K_{i12} pour $\sqrt{K_{i1} \cdot K_{i2}}$, K_{i24} pour $\sqrt{K_{i2} \cdot K_{i4}}$

A partir de ces expressions nous retrouvons les relations générales établies précédemment, à savoir :

(3,13) $$\log \frac{x^2_d}{1 - x_d} + \log (2.C) = \log K_d^*$$

(3,15) $$\log \frac{x_i}{1 - x_i} - pH = pK_i^*$$

(3,17) et $$\frac{x_t}{1 - x_t} = K_t^*$$

Desquelles nous pouvons tirer :

$$K_{d1} = 2\,C \frac{x^2_{d1}}{1 - x_{d1}} \frac{(1 + K_{t1})^2}{(1 + K_{t2})^2}$$

$$K_{d2} = 2\,C \frac{x^2_{d2}}{1 - x_{d2}} \frac{(1 + K_{t3})^2}{(1 + K_{t4})^2}$$

en milieu acide ($(H^+) \to \infty$)

(3,16bis) $$K_{i2} = \frac{K_i^*}{x_{d1}} \frac{1 + K_{t2}}{1 + K_{t4}} \left[1 + 2 \frac{(MH)}{K_{d12}} \frac{(1 + K_{t13})^2}{(1 + K_{t4})}\right]^{-1}$$

On peut également à partir de (3,7 bis) et (3,17) obtenir les valeurs des constantes de transconformation. Elles sont égales aux valeurs limites que prend K_t^* lorsque la concentration protéique de la solution, en milieu acide et en milieu basique, tend vers 0 ou vers ∞, les résultats sont représentés dans le tableau suivant.

(20 bis)

(H^+) \ C	0	∞
0	K_{t4}	K_{t3}
∞	K_{t2}	K_{t1}

Nous avons exprimé la valeur des 7 constantes d'équilibres qui définissent le système, la concentration de toutes les formes moléculaires est déterminée, nous pouvons donc connaître la valeur de toutes les constantes d'équilibre intrinsèque de ce système.

La différence la plus importante entre le modèle coopératif et le modèle non coopératif est sans doute le fait que dans ce dernier, les degrés de conversion apparents ne sont plus égaux à la fraction dissociée du groupe particulier aH :

$$x_i \neq y_t \neq y_d$$

Ce résultat montre qu'il est indispensable pour l'étude de ce modèle d'obtenir x_i par une méthode directe de titrage.

IV.- CONCLUSIONS

A.- PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

Dans l'étude de ces différents modèles nous avons vu que, conformément à ce qui a été démontré par Tanford, *la valeur du pK d'un groupe impliqué dans un changement de structure est toujours modifiée par rapport à la valeur de son pK normal*; on dit que ce groupe est anormal.

Le déplacement du pK de ce groupe est d'autant plus grand que le rôle stabilisateur de ce groupe pour une certaine structure de la molécule est plus important. Ainsi, d'après la relation (3,5) par exemple, un groupe dont l'ionisation rendrait mille fois plus probable une transconformation doit avoir une constante d'ionisation mille fois plus faible que la valeur normale, son pK s'élève de 3 unités. Il revient au même de dire, puisque les phénomènes sont réversibles, que dans la molécule non transformée l'ionisation du groupe est moins probable.

Si le changement de conformation concerne la structure secondaire ou tertiaire, seule la valeur du pK *du groupe impliqué dans le phénomène est modifié et non l'allure de la courbe de titrage dont l'équation reste de la forme* $x_i = 1/(1+(H^+)/K)$. *Si le changement de conformation intéresse la structure quaternaire, le* pK *et la forme de la courbe de titrage du groupe impliqué dans le phénomène sont modifiés,* car, comme nous l'avons vu, la valeur du pK dépend de la concentration protéique et pour une concentration C donnée la valeur de ce pK est fonction du pH :
$x_i = 1/(1+(H^+)/K.\ f(H^+))$.

Le résultat représenté par $y_t = y_d = x_i$, nous montre, qu'il s'agisse du changement de structure tertiaire ou de la structure quaternaire, que la courbe de variation du degré de conversion apparent y_t ou y_d en fonction du pH, est toujours identique à la courbe de titrage du groupe anormal associé à ce phénomène. Cette dernière conclusion n'est plus valable dans le cas d'une dimérisation où la dissociation du proton du groupe anormal de chacun des deux protomères formant le dimère ne serait pas coopérative.

L'objet de ce travail a été d'établir les différentes relations existant entre les variations corrélatives des différents phénomènes liés et de nous aider ainsi à comprendre la signification des constantes apparentes que l'on obtient expérimentalement et enfin, de permettre de calculer la valeur des constantes intrinsèques des différents équilibres.

B.- CAS PARTICULIERS

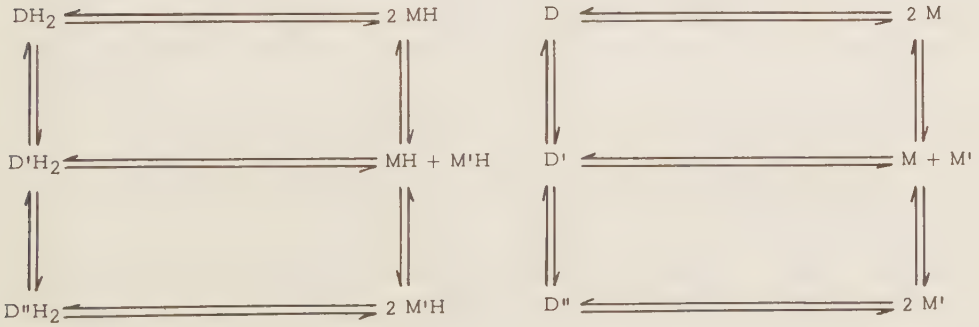
Les formules établies pour rendre compte des interactions entre un changement de structure tertiaire, une dimérisation et la fixation d'un proton sur un site particulier peuvent être utilisées après simplification, dans un certain nombre de cas moins complexes. Nous en citerons ci-dessous quelques exemples :

- Dimérisation liée à une ionisation ($K_{ti} = 0$)
- Transconformation liée à une ionisation ($K_{di} = \infty$)
- Transconformation liée à une dimérisation ($K_{ii} = \infty$)
- Dimérisation et transconformation consécutives liées à une ionisation ($K_{t1} = K_{t3} = 0$ et $k_{d3} = K_{d4} = \infty$)
- Transconformation et dimérisation consécutives liées à une ionisation ($K_{d1} = K_{d2} = 0$)
- Transconformation liée à une ionisation suivie d'une dissociation moléculaires : $K_{d1} = K_{d2} = 0$, $K_{d3} = K_{d4}$, $K_{t2} = K_{t4} = \infty$
- Dissociation suivie d'une transconformation liée à une ionisation : $K_{d1} = K_{d2}$, $K_{d3} = K_{d4}$, $K_{t1} = K_{t3} = 0$.
- ... etc...

Le nombre de variantes que l'on peut obtenir logiquement à partir du modèle complexe est considérable. Il est facile de prévoir qu'une protéine manifestant les trois phénomènes liés en équilibre, doive nécessairement présenter plusieurs variantes simplifiées du modèle complexe dans des conditions thermodynamiques différentes :

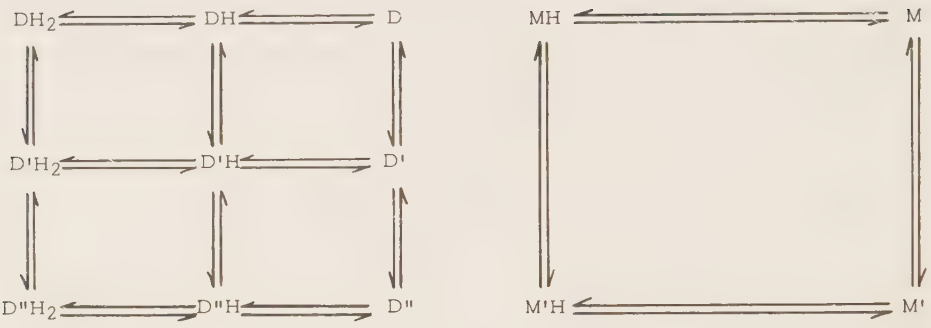
En effet, en faisant varier l'activité des ions hydrogène et la concentration de la solution protéique, on doit, sans modifier la valeur des constantes intrinsèques d'équilibre, déplacer de façon pratiquement complète l'équilibre "cubique" vers l'une des quatre faces latérales représentée ci-dessous.

En milieu acide *En milieu alcalin*



Ce sont deux cas de transconformation liée à une dimérisation.

Solution concentrée *Solution diluée*



Ce sont deux cas de transconformation liée à une ionisation.

C.- GENERALISATION

Les formules que nous avons établies peuvent s'appliquer de façon générale à tous les cas où la fixation d'un ligand est associée à un changement de structure tertiaire ou quaternaire, il suffit pour cela de remplacer, dans les formules, l'activité des ions H^+ par l'activité du ligand; les constantes d'ionisation deviennent alors des constantes de dissociation du ligand d'avec la protéine.

Ce ligand peut être un cation, un ion au sens général du terme ou n'importe quelle substance organique dont la fixation sur la protéine est associée à un changement de structure tertaire ou quaternaire de la molécule.

Remarquons que la généralisation que nous venons de faire englobe dans sa définition les coenzymes et substrats enzymatiques dont la fixation induit un ajustement de la structure de l'enzyme suivant la théorie de Koschland (60), ou encore les effecteurs allostériques dont la fixation sur l'enzyme favoriserait un changement de structure qui modifierait l'activité de cet enzyme suivant la théorie de J. Monod (80).

CHAPITRE IV — DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA TRANSCONFORMATION DE LA β-LACTOGLOBULINE

Nous venons d'étudier différents modèles de mécanismes d'interactions entre une transconformation et une dimérisation associée à la fixation d'un ligand, ce ligand étant, dans le cas particulier de la β-lactoglobuline (18 000), le proton du carboxyle anormal. Cette étude a eu pour point de départ les phénomènes observés sur la β-lactoglobuline en solution, mais s'il est vrai que l'on ne voit bien que ce que l'on s'attend à voir, nous sommes à présent mieux armés pour l'interprétation des données expérimentales.

Nous allons donc passer en revue, et discuter les principaux résultats expérimentaux que nous avons obtenus par une étude systématique de la transconformation, en fonction du pH, de la force ionique et de la température ; nous comparerons ces résultats avec ceux obtenus par d'autres chercheurs de ce laboratoire et nous essaierons de voir comment à partir des résultats théoriques nous pouvons interpréter les résultats expérimentaux.

I.- RESULTATS EXPERIMENTAUX ET LEURS INTERPRETATIONS

A.- METHODES EXPERIMENTALES

Les renseignements sur le matériel et les techniques utilisées ont été résumés plus haut, chap. II, nous ne donnerons ici que les détails concernant les solutions protéiques.

Nous avons travaillé dans la plupart des cas sur des solutions de β-lactoglobuline tamponnées entre pH 5,6 et pH 8 par des sels de phosphate de sodium et de potassium donnant une force ionique de 0,1, au-dessus de pH 8 nous avons utilisé le tampon TRIS (hydroxyméthyl aminométhane) à la même force ionique.

Une solution nouvelle est employée pour chaque série de mesures spectropolarimétriques faites à un pH donné ; la valeur du pH est mesurée à l'aide du pH-mètre décrit plus haut avec une erreur de l'ordre de ± 0,01 unité pH.

Nous avons également travaillé sur des solutions salines NaCl 0,1 M, en absence de tampon, le pH étant ajusté par addition, à la microseringue, de solution de soude déci-normale et d'acide chlorhydrique à la même normalité afin de vérifier plus facilement la réversibilité.

Notons qu'aucune différence significative n'a été observée dans les propriétés rotatoires de la β-lactoglobuline en solution dans les tampons de nature différente ou en solution saline de NaCl seul, toutes autres conditions de pH, de force ionique et de température étant égales par ailleurs.

Les mesures de dispersion rotatoire à différents pH et à la force ionique $\mu = 1$ sont faites sur des solutions protéiques tamponnées par des sels de phosphate ou par du TRIS, $\mu = 0{,}1$ comme les solutions précédemment décrites mais additionnées de NaCl afin d'obtenir la force ionique désirée $\mu = 1$.

L'étude de l'effet de la température a été faite sur des solutions tamponnées dont la valeur du pH a été mesurée à la température de 20°C ; les variations de pH dues à l'augmentation de température ont été corrigées d'après les données de la littérature (3), elles sont d'ailleurs négligeables pour le tampon phosphate et de l'ordre de 0,02 unité pH par degré pour le tampon TRIS.

Le protocole expérimental est le suivant :

Les mesures de dispersion rotatoire sont d'abord faites à 20°C puis la solution est portée rapidement à la température désirée ; nous attendons alors que les mouvements de convections et les phénomènes de biréfringence disparaissent pour faire les mesures ; celles-ci faites, nous ramenons la solution à la température initiale pour nous assurer de la réversibilité de l'effet thermique.

B.- ETUDE SPECTROPOLARIMETRIQUE

1.- INTRODUCTION

Nous avons vu au chapitre III que la dispersion rotatoire de la lactoglobuline B en solution aqueuse à son pH isoionique, suit parfaitement la loi simple de Drude dans l'intervalle de longueur d'onde que nous utilisons habituellement soit de 546 à 313 mμ. Les expériences faites dans d'autres conditions de pH, de force ionique et de température, montrent que dans l'intervalle de longueurs d'ondes utilisées, la lactoglobuline obéit toujours à la loi de Drude à un terme, c'est-à-dire que la variation de $1/(\alpha)$ en fonction de λ^2, ne présente aucun écart à la linéarité et est correctement représentée par l'équation :

$$[\alpha] = A/(\lambda^2 - \lambda^2) \text{ ou encore } 1/[\alpha] = \lambda^2/A - \lambda^2/A$$

ultérieurement nous introduirons des termes supplémentaires, dans cette équation pour mieux rendre compte des résultats obtenus.

Toute modification du milieu entraînant une modification de la structure de la protéine se traduit par un changement plus ou moins grand de la valeur des paramètres rotatoires $[\alpha]_\lambda$ et A et souvent aussi de λ_c. Lorsqu'une variation de A est accompagnée d'une variation de λ_c on ne peut plus considérer que A est une grandeur additive, nous utiliserons donc, pour les mesures quantitatives, la valeur de $[\alpha]_\lambda$ qui suit toujours la règle d'additivité.

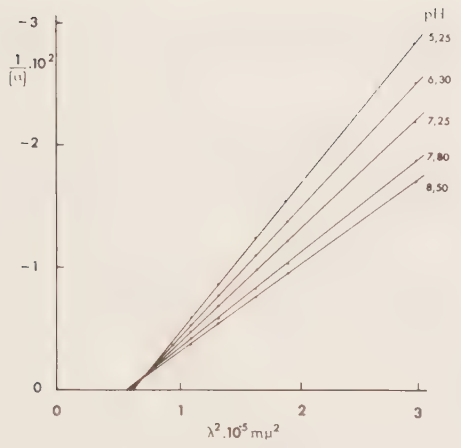


Fig. 14 - Dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline B à 20° C, $\mu = 0,1$ à différents pH, dans la représentation de la loi de Drude ;

$$\frac{1}{[\alpha]} = \frac{\lambda^2}{A} - \frac{\lambda_c^2}{A}$$

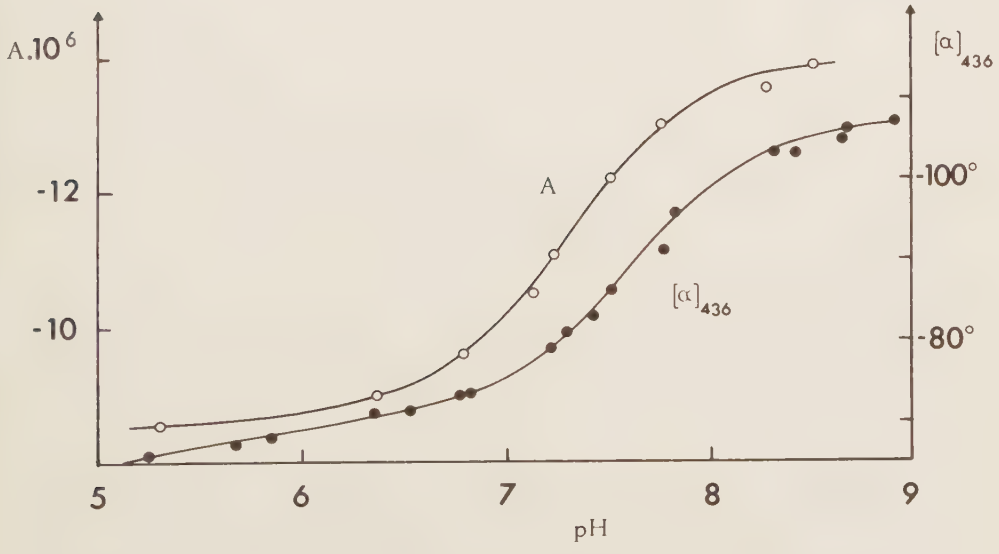


Fig. 15 - Variation du coefficient A de l'équation de Drude, et de $[\alpha]_{436}$ en fonction du pH - pour la β-lactoglobuline B, à 20° C $\mu = 0,1$.

2.- VARIATIONS DES PROPRIETES ROTATOIRES DE LA β-LACTOGLOBULINE EN FONCTION DU pH

La dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline B, fig. 14 et 15, varie très nettement en fonction du pH dans la zone comprise entre 6 et 9. Cette variation de pouvoir rotatoire paraît être instantanée, c'est-à-dire inférieure à une vingtaine de secondes, ce qui est le temps minimum nécessaire pour modifier le pH d'une solution protéique non tamponnée par addition de NaOH ou de HCl, homogénéiser et faire une première observation. Cette variation rapide du pouvoir rotatoire est parfaitement réversible ; cependant en milieu alcalin se produit, nous le verrons, un autre changement de structure, lent et irréversible, qui au-delà de pH 8,5 rend les mesures de pouvoir rotatoire incertaines.

Zone de pH inférieure à 6

La valeur du pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline au-dessous de pH 6 comme nous pouvons le voir fig. 18, varie légèrement avec le pH. Comme l'indique Tanford (116) cette variation de $[\alpha]$ semble être une fonction linéaire de la charge électrique de la protéine ; cette hypothèse est confirmée ici, fig. 18, puisque lorsqu'on augmente la force ionique μ de 0,1 à 1, c'est-à-dire lorsqu'on réduit les interactions électrostatiques, la pente de courbe représentant la variation de $[\alpha]$ en fonction du pH est fortement réduite.

Nous pouvons donc dans cette zone de pH évaluer $\partial [\alpha] / \partial z$, z étant la charge spécifique de la protéine (le nombre de charges par gramme de protéine). Nous obtenons les valeurs suivantes :

$$\frac{\partial (\alpha)}{\partial z} = 1{,}4 \cdot 10^4 \text{ pour } \mu = 0{,}1$$

et

$$\frac{\partial (\alpha)}{\partial z} = 1{,}5 \cdot 10^3 \text{ pour } \mu = 1 \text{ pour } \lambda = 436 \text{ m}\mu$$

Nous remarquerons que de $\mu = 0{,}1$ à $\mu = 1$ la variation de pouvoir rotatoire due à l'augmentation de la charge a été divisée par un facteur dix.

Zone de pH comprise entre 6 et 9

Au-dessus de pH 6 la variation de $[\alpha]$ n'est plus proportionnelle à la charge de la protéine ; un phénomène nouveau apparaît et la variation de pouvoir rotatoire qu'il entraîne se surajoute à la variation de pouvoir rotatoire due aux effets de l'augmentation de charge.

La représentation graphique de la variation des paramètres rotatoires de la β-lactoglobuline en fonction du pH décrit une courbe en S, cela indique qu'il se produit une transition entre deux états, ces états sont définis par les propriétés rotatoires de la molécule à l'état initial et à l'état final, c'est-à-dire par les valeurs de $[\alpha]$, A et λ_c dans les parties asymptotiques de la courbe sigmoïde. Ces asymptotes n'étant pas des droites horizontales en raison de l'effet de la charge électrique, nous prendrons pour les valeurs des paramètres rotatoires à l'état initial et à l'état final la valeur des ordonnées des différentes asymptotes au pHi où la charge nette de la protéine est nulle par définition.

Les résultats obtenus à 20° et à force ionique $\mu = 0,1$ sont représentés dans le tableau suivant :

	$[\alpha]_{589}$	$[\alpha]_{436}$	$[\alpha]_{365}$	A	λ_c
Etat initial	- 29°	- 64°	- 113°	- 8,5 10^6	247 mμ ± 1 mμ
Etat final	- 52°	- 105°	- 168°	- 14 10^6	236 mμ ± 1 mμ

Cette modification des paramètres rotatoires en fonction du pH est trop importante pour pouvoir être attribuée à la simple dissociation acide-base de quelques groupes titrables de la protéine; l'ionisation de ceux-ci doit donc être associée à une transconformation de la protéine.

Discussion

Si cette transconformation était une transition hélice-pelote nous pourrions connaître la proportion de structure en hélice α, qui aurait disparu au cours de la transformation en appliquant la relation empirique de Doty :

$$100 \cdot \frac{\Delta\lambda_c}{140} = x\ \%\ \text{de structure en hélice}\ \alpha$$

D'après le tableau ci-dessus nous voyons que la variation de λ_c entre l'état initial et l'état final est de 11 mμ, ce qui donnerait $x = 8$ % et correspondrait, pour les 164 résidus d'amino-acide que comprend le protomère de β-lactoglobuline, à l'effondrement de 3,6 spires d'hélice.

D'après le même tableau, nous pouvons remarquer que la variation de $[\alpha]$ est relativement élevée par rapport à la variation de λ_c : $\Delta [\alpha]_D / \Delta\lambda_c = 2$, or pour les transitions hélice-pelote bien caractérisées $\Delta [\alpha]_D / \Delta\lambda_c \simeq 0,6$. Cette transconformation n'est donc pas une simple transition hélice α-pelote statistique.

Sachant d'une part, que la valeur du pouvoir rotatoire des polypeptides dépend fortement de la nature du solvant (135), et d'autre part, que l'effondrement de structure β s'accompagne d'une augmentation de λ_c, nous pouvons penser que la forte variation de $[\alpha]$ par rapport à la variation de λ_c traduit, soit une modification des interactions protéine-solvant au cours de la transition hélice-pelote où seraient impliqués des résidus apolaires, soit une perte simultanée de structure en hélice α et de structure β qui par compensation pourrait expliquer la variation faible de λ_c.

Ce changement de conformation de la β-lactoglobuline procède-t-il par étapes successives et discrètes, ou sans intermédiaire aucun entre l'état initial et l'état final ? La présence d'un point isobestique en spectrophotométrie permettrait de confirmer la deuxième hypothèse; en spectropolarimétrie la même indication peut nous être donnée en utilisant un diagramme de Darmois, conçu spécialement pour l'étude des mélanges. Ce diagramme s'obtient en traçant, sur un graphique représentant les variations de $[\alpha]$ en fonction de λ pour différentes compositions du mélange, les droites joignant les points homologues pour les longueurs d'onde λ_1 et λ_2. Si l'on a affaire à un mélange binaire toutes ces droites concourent en un même point.

Nous avons donc, sur un diagramme, porté les valeurs de $[\alpha]_{365}$ et de $[\alpha]_{436}$ correspondant à des solutions de β-lactoglobuline de pH compris entre 6 et 9, fig. 16, ces valeurs de $[\alpha]$ sont corrigées de l'effet de charge. Les droites passant par les points représentant la valeur de $[\alpha]_{365}$ et de $[\alpha]_{436}$ obtenues pour une même valeur de pH sont concourantes. Entre pH 6 et 9 la solution de β-lactoglobuline peut donc être considérée comme un mélange, aux proportions définies, de deux formes de molécule en équilibre se transformant l'une en l'autre en fonction du pH. Cependant il est impossible par cette méthode de savoir si l'état initial et l'état final correspondent à une forme pratiquement pure ou à un mélange des deux.

3.- VARIATIONS DE PROPRIETES ROTATOIRES DE LA LACTOGLOBULINE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION PROTEIQUE

Nous avons d'après les travaux de Cl. Georges, S. Guinand et J. Tonnelat (1962) que le dimère de β-lactoglobuline se dissocie en deux unités quand on fait varier de 6 à 9 le pH de la solution protéique ; le déplacement d'un équilibre de dimérisation étant un exemple typique de réaction procédant sans intermédiaire, on peut se demander si cette réaction ne serait pas la cause directe de la modification de la dispersion rotatoire que l'on observe dans cette zone de pH.

Le changement de pouvoir rotatoire lors d'une dimérisation pourrait être dû au démasquage d'une aire de contact hydrophobe créant de nouvelles intéractions protéine-solvant. Ces interactions, nous l'avons vu, pourraient expliquer une modification de pouvoir rotatoire sans changement de structure tertiaire de la molécule.

On pourrait encore, comme Herskovits *et al* (1964) interpréter le changement de pouvoir rotatoire observé au cours d'une dimérisation par le passage d'une structure dimère possédant un axe de symétrie binaire à une structure monomère ne possédant ni axe ni centre de symétrie moléculaire, c'est-à-dire par une perte de symétrie à l'échelle macromoléculaire.

Or nous savons que le dimère de β-lactoglobuline peut se dissocier, non seulement, au-dessus du point isoélectrique mais aussi au-dessous du point isoélectrique (124) ; par conséquent on devrait s'attendre à observer la même variation de pouvoir rotatoire au cours de ces deux dimérisations : il en est rien, aucun changement de pouvoir rotatoire de l'importance de celui observé entre pH 6 et 9 n'est mis en évidence dans la zone acide de l'échelle des pH.

Nous pouvons donc affirmer que la dimérisation seule ne peut permettre d'expliquer un changement important des propriétés rotatoires de la β-lactoglobuline. Cependant la dimérisation pourrait favoriser une transconformation qui ne serait possible qu'au-dessus du point isoélectrique. Il existerait dans ce cas une interdépendance entre les phénomènes de dimérisation et de transconformation, et l'on devrait pouvoir alors mettre en évidence que le phénomène de transconformation n'est pas entièrement indépendant de la concentration protéique de la solution.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons mesuré à pH 7,5 (voisin du pH de demi-transition), le pouvoir rotatoire spécifique de la β-lactoglobuline B en fonction de la concentration jusqu'à des valeurs de concentrations aussi faible que 0,2 mg/ml.

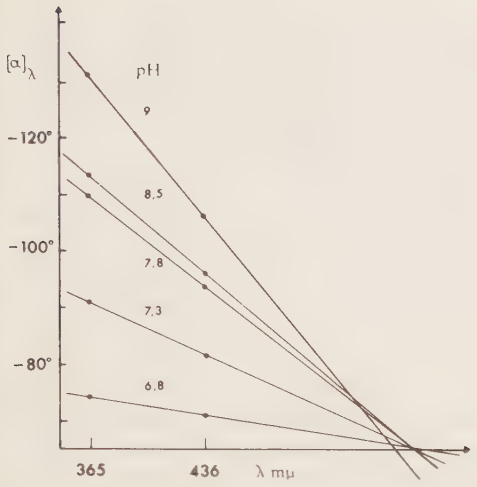


Fig. 16 - Diagramme de Darmois représentant la dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline B à différents pH. A pH 9, début de dénaturation.

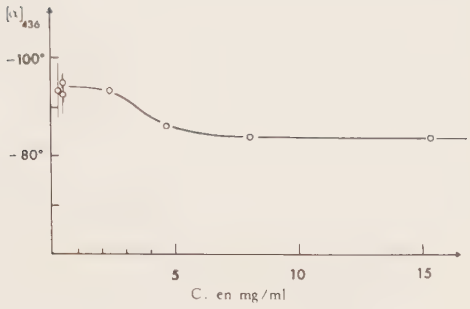


Fig. 17 - Variation du pouvoir rotatoire spécifique de la β-lactoglobuline B en fonction de la concentration protéique à pH 7,5 en tampon phosphate $\mu = 0,13$, à 20°C (mesures faites à l'aide du photopolarimètre Jouan).

Le résultat obtenu, représenté par la figure 17, montre que la valeur de $[\alpha]_{436}$ varie très peu avec la concentration au-dessus de 5mg/ml. Pour des concentrations inférieures à 5 mg/ml apparaît une augmentation de pouvoir rotatoire supérieure à l'erreur expérimentale et qui pourrait traduire une interdépendance entre la transconformation et la dimérisation, car la dimérisation seule nous l'avons vu ne produit pas de variation de $[\alpha]$ et la transconformation seule ne peut dépendre de la concentration. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que la variation de $[\alpha]$ apparait de façon nette à partir de valeurs de la concentration moléculaire d'un même ordre de grandeur que la valeur de la constante apparente de dimérisation déterminée par vitesse de sédimentation et par diffusion de la lumière (33) pour cette valeur de pH.

Il semble donc qu'il existe une transconformation et une dimérisation en tant que phénomènes distincts mais possédant entre eux des relations d'interdépendances, c'est ce que nous allons essayer de mettre en évidence par l'étude de la variation de $[\alpha]_{436}$ en fonction du pH, de la température et à différentes forces ioniques.

4.- ACTION DU CHLORURE DE SODIUM MOLAIRE SUR LA STRUCTURE DE LA β-LACTOGLOBULINE

On peut considérer que l'augmentation de la concentration saline d'une solution aqueuse produit deux effets non spécifiques :

- Le premier, dû à l'augmentation de la force ionique de la solution, est un affaiblissement des interactions électrostatiques entre les différents ions et macroions en présence dans la solution, conformément à la théorie de Debye et Huckel ; il produit également une diminution des interactions entre les différents groupes chargés d'une même macromolécule (Linderstrøm-Lang (1952).

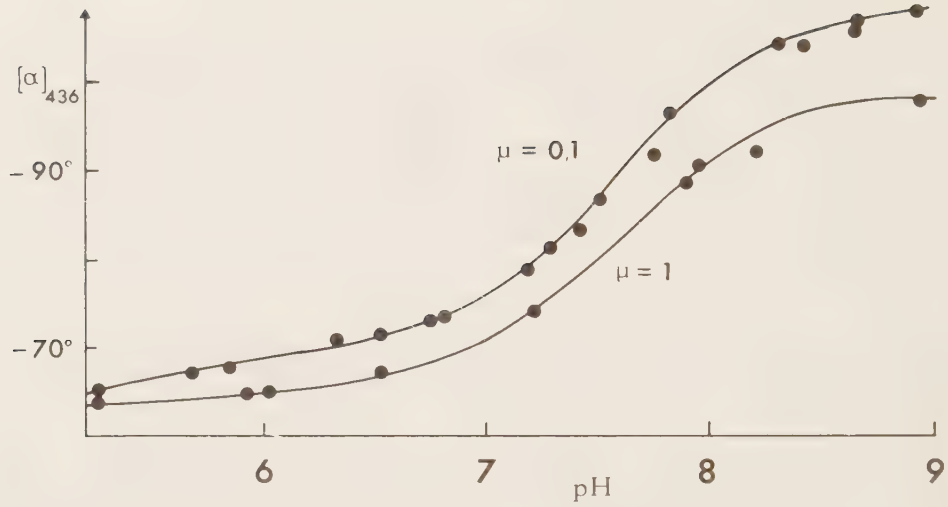


Fig. 18 - Variation du pouvoir rotatoire spécifique de la β-lactoglobuline B, en fonction du pH à 20°C pour *les forces ioniques* $\mu = 0,1$. courbe 1, et $\mu = 1$ (NaCl 1 M) courbe 2.

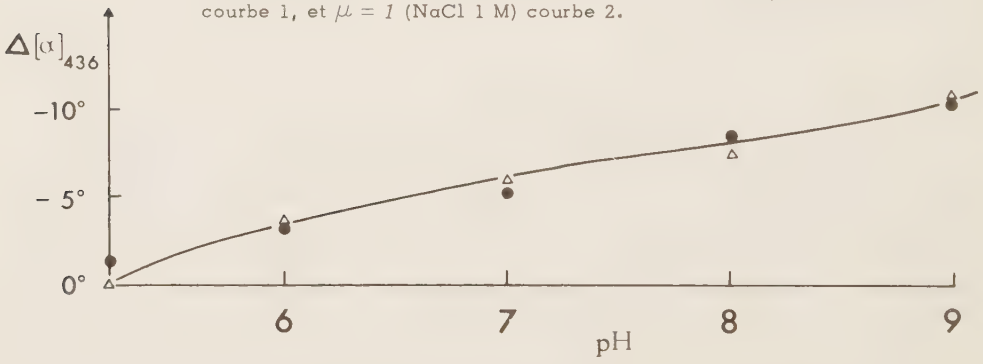


Fig. 19 - Variation de $[\alpha]^{0,1}_{436} - [\alpha]^{1}_{436}$ en fonction du pH valeurs -●- obtenues à partir de la figure 9.
valeurs obtenues à partir de la figure 9.
-△- Variation de $\frac{d[\alpha]}{dz}$ z (soit $1,4.\ 10^4$ z) en fonction du pH pour la β-lactoglobuline B à 20°C et pour $\mu = 0,1$.

- L'autre effet porte sur la structure microcristalline de l'eau liquide : En présence de sels un certain nombre de molécules d'eau en s'orientant au voisinage de la surface des ions ne peuvent plus participer à la structure tétraèdrique de l'eau (Frank et Evans (1945) favorable à la solvatation des chaînes latérales apolaires de la protéine (Kauzmann 1954), (Klotz 1958).

Aux fortes concentrations salines, s'ajoute à ce dernier effet une diminution sensible de l'activité de l'eau.

Nous allons voir lequel de ces deux effets est le plus important sur la structure et la transconformation de la β-lactoglobuline lorsque l'on augmente la concentration en NaCl de la solution protéique.

Nous avons étudié la dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline B en fonction du pH en présence de NaCl 1 M et à 20°C. Nous avons obtenu pour les différentes valeurs de pH une courbe de dispersion rotatoire obéissant parfaitement à la loi de Drude à un terme et caractérisée par des constantes de dispersion rotatoires A et $[\alpha]_\lambda$ moins élevées en valeur absolue et par une valeur de λ_c plus grande que celles obtenues pour $\mu = 0{,}1$. Nous avons porté sur une même figure (18) la variation de $[\alpha]_{436}$ en fonction du pH à 20°C pour μ 0,1 et μ 1.

Nous remarquerons que la différence entre ces deux courbes est d'autant plus grande que la valeur du pH est plus élevée. Pour étudier l'effet de la force ionique sur la structure de la β-lactoglobuline, nous avons représenté (fig. 19) sur un même graphique, en fonction du pH, la variation d'ordonnée entre ces deux courbes et la variation $[\partial[\alpha]/\partial z]$. z obtenue pour μ 0,1.

Ces deux courbes de la figure 19 sont identiques aux erreurs d'expériences près, ce qui prouve sans ambiguité que l'action du sel (NaCl 1M) a pour effet de diminuer le pouvoir rotatoire de la protéine d'une valeur égale à $(\partial[\alpha]/\partial z)z$, c'est-à-dire de diminuer considérablement l'effet des interactions électrostatiques.

Cette expérience montre qu'en dehors de toute transconformation spécifique, les valeurs des paramètres rotatoires $[\alpha]$ A et λ_c sont modifiées sous l'influence des interactions électrostatiques dans le sens d'une expansion ou d'une désorganisation de la structure de la molécule quand augmentent ces répulsions électrostatiques. *Il apparait donc que l'on ne peut pas considérer en toute rigueur la β-lactoglobuline comme une molécule indéformable.*

5.- EFFET D'UNE ELEVATION DE TEMPERATURE SUR LA TRANSCONFORMATION DE LA β-LACTOGLOBULINE

Nous pouvons là encore distinguer deux effets possibles :

- L'un sur le solvant aqueux où l'agitation thermique des molécules d'eau rend moins probable la formation de structures microcristallines et a pour effet d'augmenter l'enthalpie libre de solvatation des résidus apolaires de la protéine ; l'élévation de température d'une solution aqueuse rendrait donc relativement plus stable la structure d'une protéine dissoute dans laquelle les groupes apolaires seraient soustraits au solvant, car il faudrait alors une énergie plus grande pour porter ces groupes " hydrophobes " au contact du solvant aqueux (Tanford 1962) (Brandts 1964).

L'autre effet est plus général et mieux connu : c'est l'effet de la chaleur sur l'accroissement de l'énergie de rotations et de vibrations des différents groupes d'atomes d'une molécule. L'énergie $\epsilon = kT$ que possèdent les molécules correspond à une fréquence de passage à l'état activé de certains groupes d'atomes : $\nu = kT/h$. L'augmentation de la température absolue T modifiera donc la valeur des constantes de vitesse et des constantes d'équilibre des différents phénomènes susceptibles de se produire au niveau de la molécule protéique. La manière dont évoluent ces phénomènes en fonction de la température nous permettra de mieux comprendre leur mécanisme et d'évaluer les énergies mises en jeu.

Nous avons déterminé les courbes de dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline à 40° pour différentes valeurs du pH à μ 0,1. Ces courbes sont comparables à celles obtenues à 20°C, elles en diffèrent cependant par une valeur plus faible des paramètres rotatoires $[\alpha]_\lambda$, A et λ_c. Nous avons représenté, fig. 20, la variation de $[\alpha]_{436}$ en fonction du pH, obtenue à 40°C et 20°C pour μ 0,1.

Comme nous pouvons le remarquer, fig. 20, la courbe de variation de $(\alpha)_{436}$ en fonction du pH pour μ 0,1 obtenue à 40°C présente la même allure générale que celle obtenue à 20°C, on peut noter cependant des différences sur quelques points particuliers.

1.- Nous constaterons tout d'abord que la courbe de transition a subi, entre 20 et 40°C, une translation de 0,2 unité pH vers les faibles valeurs de pH, ce qui traduit un déplacement de l'équilibre de transconformation sous l'effet de la température.

2.- La variation de pouvoir rotatoire due aux interactions électrostatiques, déterminée d'après la pente de la courbe au-dessous de pH 6, est plus importante lorsque la température est plus élevée. Ceci est imputable à une augmentation de $\partial[\alpha]/\partial z$, plutôt qu'à une variation de $\partial z/\partial$ pH qui est faible en fonction de la température comme le montrent, fig. 21, les courbes calculées à partir de l'équation (5,2). La protéine semble donc plus déformable en fonction de la charge quand la température augmente.

3.- La différence de pouvoir rotatoire entre l'état final et l'état initial de la transition, corrigée de l'effet de charge, passe de -35° à -37° quand la température croît de 20 à 40°C. Cet effet peut être dû soit à un accroissement du nombre de résidus d'amino-acide mis en jeu dans la transconformation moléculaire quand la température s'élève.

4.- Enfin un dernier effet se surajoute aux trois précédents : il se traduit par une translation verticale de la courbe sigmoïde de $\Delta[\alpha]_{436} = -3°$, quand la température passe 20 à 40°C. Cet effet est indépendant de la charge de la protéine et du pH de la solution, il ne dépend que de la température. Ceci peut s'interpréter comme étant dû à une augmentation du nombre de molécules transformées à l'état initial par suite de la rupture de liaisons hydrogènes ou d'une diminution des interactions hydrophobes sous la seule influence de la température.

Ces différents effets observés entre 20 et 40°C sont parfaitement réversibles et reproductibles. Il était intéressant évidemment d'étudier à températures supérieures à 40°C le changement de pouvoir rotatoire en fonction du pH.

Nous avons pour cette étude utilisé les résultats obtenus par M. Dupont (24bis) qui a étudié la variation du pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline en fonction de la température de 20 à 80°C et pour les valeurs de pH suivantes : 5,2 - 5,8 - 6,5 - 6,84 et 7,4.

A partir de ces courbes de transition thermiques, on peut connaître pour une température donnée la valeur de $[\alpha]_{436}$ correspondant aux pH indiquées ci-dessus. Ces valeurs de pouvoir rotatoire sont fortement affectées par la présence d'intéractions électrostatiques dont la valeur dépend du pH et de la température de la solution. Pour obtenir des courbes de variation de $[\alpha]_{436}$ en fonction du pH corrigées de l'effet de charge, il était nécessaire de connaître cet effet.

Nous avons donc calculé la variation de la charge moyenne $\bar{Z}$ de la protéine en fonction du pH à différentes températures. Sachant que la charge d'une protéine est égale à :

$$\bar{Z} = \Sigma (COO^-) - \Sigma (NH_3^+) + \Sigma (tyr\text{-}O^-) \quad (5,1)$$

nous pouvons, à partir de la valeur de $pK_{int.}$ et de $\Delta H°$ des différents groupes titrables de la β-lactoglobuline donnée par Nozaki *et al*, calculer la valeur de $\bar{Z}$ de cette protéine en fonction du pH et à différentes températures.

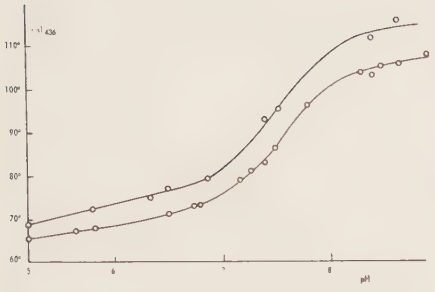


Fig. 20 - Variation du pouvoir rotatoire spécifique de la β-lactoglobuline B en fonction du pH, $\mu = 0,1$, *à 20°C et 40°C.*

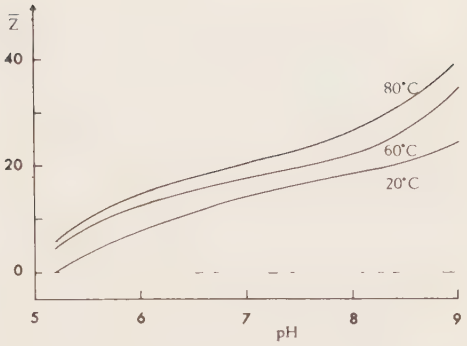


Fig. 21 - Variation de la charge de la β-lactoglobuline en fonction du pH à 20°, 60° et 80°C (les courbes à 60 et 80°C ont été obtenues par le calcul - voir texte).

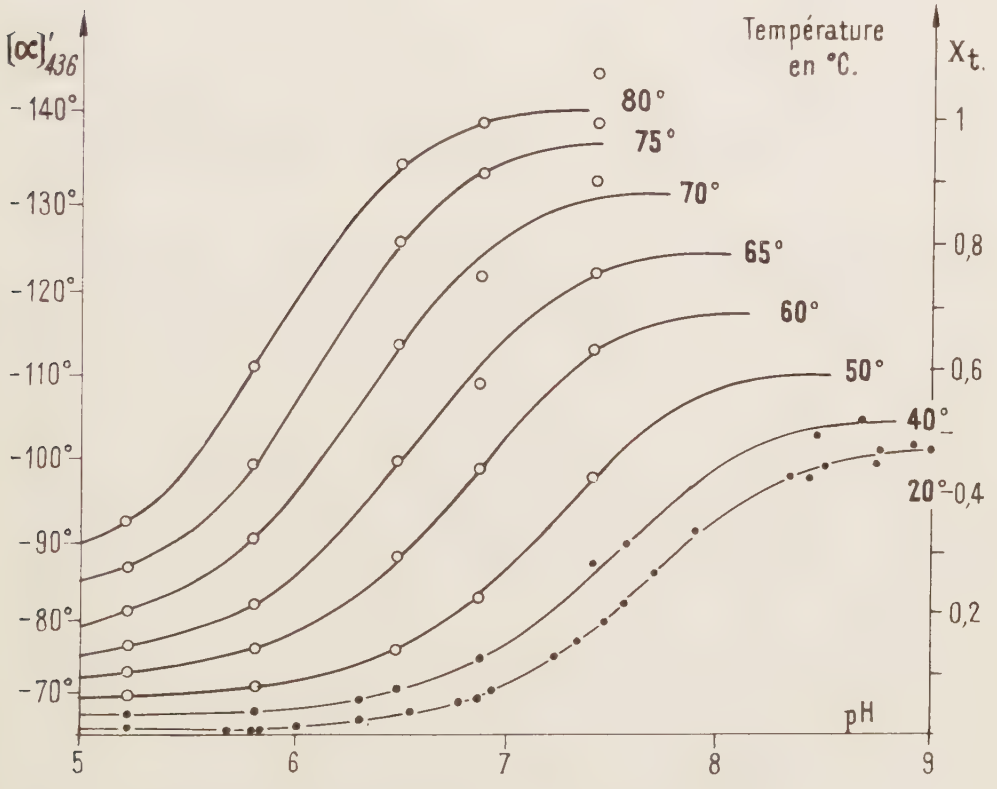


Fig. 22 - Variation du pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline en fonction du pH et à différentes températures comprises *entre 20 et 80°C* - $\mu = 0,1$.

- O - Valeurs obtenues à partir des courbes de transition thermique de la β-lactoglobuline publiées par M. Dupont (23).

- ● - Nos propres mesures faites à température constante.

Nous avons corrigé ces valeurs de l'effet dû aux interactions électrostatiques.

TABLEAU (d'après Nozaki *et al*)

Groupes	$pK_{int.}$ (à 20°C)	$\Delta H°$Kcal/mole w = 0,039
1 COOH terminal	3,75	1
25 COOH latéraux	4,7	1
1 COOH anormal	7,5	8
2 imidazoles	7	7
1 NH_3^+ terminal	7,8	11
14 NH_3^+ latéraux	9,9	10
3 NH_3^+ (arg.)	12	
4 OH (tyr.)	10,2	

Nous pouvons écrire pour la β-lactoglobuline :

(5,2) $\overline{Z} = 1\alpha_1 + 25\alpha_2 + 1\alpha_3 - 2(1-\alpha_4) - 1(1-\alpha_5) - 14(1-\alpha_6) - 3(1-\alpha_7) + 4\alpha_8$

α_i la fraction du groupe dissocié est égale à $1/(1 - H^+/K_i)$.

Cette expression nous a permis de calculer la valeur de $\overline{Z}$ en fonction du pH à différentes températures, nous avons représenté sur la figure 21 ces valeurs obtenues à 20°, 60° et 80°C. Connaissant maintenant la forme de ces courbes de variation de $\overline{Z}$ en fonction du pH, nous pouvons corriger de l'effet de charge la courbe de variation de $[\alpha]_{436}$ obtenue en fonction du pH.

Les points expérimentaux obtenus par M. Dupont, après correction de l'effet de charge, se placent sur des courbes semblables à celle que nous avons obtenue à 20°C en présence de NaCl 1 M, c'est-à-dire lorsque l'effet de charge était pratiquement nul. Nous verrons plus loin que l'équation de cette courbe correspond à une équation dont la forme générale a été établie au chapitre IV.

Les courbes de variation de $[\alpha]_{436}$ en fonction du pH ainsi obtenue à différentes températures, sont représentées sur la figure 22.

Nous remarquerons que les différences apparues entre 20 et 40°C s'accentuent pour les températures plus élevées. *La transconformation de la molécule se produit dans une zone de pH d'autant plus basse que la température est plus élevée.* Le nombre de molécules transformées à l'état final semble croître avec la température jusqu'à 80°C où la transformation paraît être totale à pH 6.

C.- ETUDE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE LA β-LACTOGLOBULINE

1.- EN FONCTION DU pH

Le spectre d'absorption de la β-lactoglobuline ne subit que d'infimes modifications dans la zone de pH où l'on observe par d'autres méthodes des changements importants de la structure de la protéine. Cependant, les différences de spectres entre solutions de β-lactoglobuline à des pH différents peuvent être enregistrées, à l'aide du spectrophotomètre Cary 15, sur une échelle de densité optique étalée de 0 à 0,1 avec une précision suffisante pour permettre une étude qualitative et quantitative des phénomènes responsables de telles différences de spectres.

Fig. 23 - Spectres de différences d'absorption de la β-lactoglobuline A en solution aqueuse (2 mg/ml, à 20°C) au pH indiqué, référence prise à pH 6.

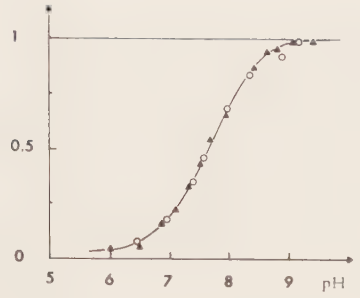


Fig. 24 - Variation de la fraction de β-lactoglobuline transformée en fonction du pH, $\mu = 0,1$ et à 20°C.

- ▲ - Variation de $\dfrac{(\Delta D_{286} - \Delta D_{283})_{pH\ x}}{(\Delta D_{286} - \Delta D_{283})_{pH\ 9}}$

- O - Variation de $\dfrac{[\alpha]_{pH\ x} - [\alpha]_{pH\ 6}}{[\alpha]_{pH\ 9} - [\alpha]_{pH\ 6}}$

pour $\lambda = 436$ mμ.

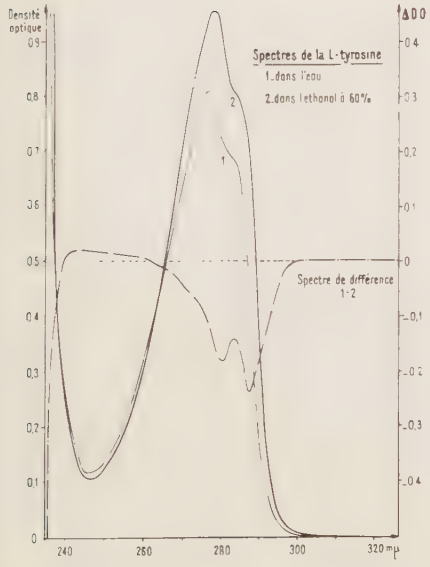


Fig. 25

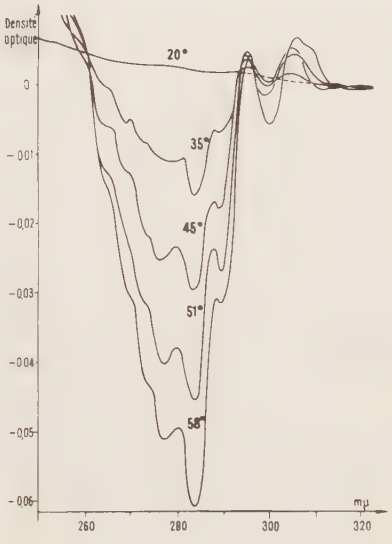


Fig. 26 - Spectres de différences de la β-lactoglobuline A, c = 1,96 mg/ml en tampon phosphate pH 6,9, $\mu = 0,1$ à différentes températures, référence prise à 20°C.

La solution de référence étant prise à pH 6, ces spectres, fig. 23, présentent deux maximums (en valeur absolue) pour les longueurs d'onde 286 et 278 mμ séparés par un minimum à 283 mμ. La différence ΔD de densité optique entre le maximum à 286 mμ et le minimum à 283 mμ peut être mesurée avec une erreur absolue de densité optique de 0,001, ce qui correspond à une erreur relative de l'ordre de 3 à 5 %.

Nous avons porté sur le même graphique, fig. 24, la variation de ΔD en fonction du pH et la variation de $[\alpha]_{436}$ obtenue dans les mêmes conditions de pH et de température (20° C). On constate que l'ensemble des points expérimentaux se place sur une même sigmoïde dont l'équation sera donnée plus loin.

Après dénaturation alcaline de la protéine nous n'observons plus ni la variation d'absorption, ni la variation de pouvoir rotatoire que présentait la protéine native, d'autre part nous savons qu'alors le carboxyle anormal de la protéine est irréversiblement démasqué (113). L'ensemble de ces faits prouve que la modification du spectre en fonction du pH est étroitement associée au changement de structure de la protéine. L'influence du pH sur ce changement de structure résulte comme l'ont montré Tanford *et al* (1961) de l'ionisation du carboxyle anormal.

On peut se demander quelle est l'origine de la différence de spectre que nous observons au cours de cette transconformation :

D'après les expériences de J. Foss (1961) que nous avons reproduites, fig. 25, nous savons que le spectre de différence, entre la tyrosine en solution aqueuse et la tyrosine en solution hydro-alcoolique, est tout à fait semblable à celui représenté ci-dessus, fig. 23. Cette observation nous amène à penser que les spectres de différences (fig. 23), obtenus à partir de solutions aqueuses de β-lactoglobuline, pourraient être attribués à une variation de spectre d'absorption d'au moins un résidu tyrosine par monomère. Puisque cette variation d'absorption est concomitante d'une variation de structure, on peut penser que ce groupe tyrosyle est probablement enfoui, aux faibles valeurs de pH, à l'intérieur de la protéine dans une région hydrophobe de basse constante diélectrique et peu polaire et viendrait, pour les valeurs de pH supérieures à 6, au contact du solvant libre à la faveur du réarrangement de la structure protéique.

Notons que Tanford a pu donner la même interprétation (116) pour expliquer l'ionisation à un pH anormalement élevé du carboxyle anormal associé au changement de conformation de la β-lactoglobuline. Cependant le résultat que nous avons obtenu apporte une confirmation expérimentale de l'existence du démasquage d'une région hydrophobe au cours de la transconformation.

Il semble donc, que dans une région hydrophobe de β-lactoglobuline un groupe tyrosyle soit impliqué avec le groupe carboxylique anormal dans le changement de conformation que subit chacun des deux protomères entre pH 6 et 9.

2.- EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

Lorsque l'on modifie la température d'une solution de β-lactoglobuline on observe, comme le montre la figure 26, que cette solution présente un spectre de différence par rapport à une solution maintenue à température constante. Cette modification du spectre est rapide et entièrement réversible.

La différence d'absorption, mesurée à 275 mμ, varie avec la température de la solution.

A pH 5,25, cette variation est une fonction linéaire de la température entre 23° et 80°C et entre 23° et 2°C. Les deux segments de droites ont des pentes légèrement différentes (fig. 27).

A pH 6,9, en tampon phosphate, la variation de densité optique à 275 mμ en fonction de la température est représentée par une courbe, d'abord confondue, jusqu'à 30°C, avec celle obtenue à pH 5,25 ou à pH 6 ; elle s'en écarte ensuite en décrivant une sygmoïde (fig. 27). Aux fortes températures la thermodénaturation irréversible rend les mesures incertaines.

La différence d'ordonnée entre les courbes obtenues à pH 5,25 et pH 6,9 est une courbe de forme sigmoïde à asymptotes horizontales (fig. 27). Cette variation de densité optique est à rapprocher de la variation de pouvoir rotatoire observée dans des conditions semblables par Dupont (1964). La courbe sygmoïde (fig. 27b) semble donc traduire le déplacement complexe de l'équilibre de transconformation et de dimérisation de la β-lactoglobuline en fonction de la température.

La variation linéaire de la densité optique en fonction de la température est due à un effet non spécifique sur la structure de la protéine et sur le solvant. Cet effet est indépendant du pH de la solution entre pH 5,25 et pH 8 ; il pourrait traduire une expansion de la molécule et une modification des interactions protéine-solvant.

D.- DISSOCIATION MOLECULAIRE REVERSIBLE

Bien qu'il ne s'agisse là nullement de résultats personnels, étant donné l'importance du phénomène de dissociation moléculaire pour l'étude et la compréhension des changements de structure de la molécule de β-lactoglobuline, nous avons cru bon de rappeler ici l'essentiel des phénomènes observés.

La dissociation moléculaire réversible de la β-lactoglobuline a été étudiée au laboratoire par C. Georges et S. Guinand par les techniques de diffusion de la lumière et de vitesse de sédimentation (33) (34). Les principaux résultats expérimentaux sont représentés par les courbes de la figure 28, que l'on ne manquera pas de rapprocher de celles de la figure 22, obtenus par polarimétrie. Ces courbes représentent la variation de l'intensité lumineuse. I, diffusée par unité de concentration de β-lactoglobuline B en fonction du pH à différentes températures pour des concentrations voisines de 2.10^{-4} M. et $\mu = 0,1$. Rappelons que d'après de Debye, la valeur de I/C est proportionnelle à la masse moléculaire moyenne du corps dissous, à condition que C soit suffisamment petit pour que $2BC \simeq 0$.

Nous remarquerons qu'à 20°C la courbe de variation de I/C n'atteint pas à pH 6 la valeur correspondant à l'intensité diffusée par le dimère seul et de même à pH 9 la valeur de I/C tend de façon asymptotique vers une valeur très supérieure à celle correspondant au monomère seul.

Il existe donc au voisinage de pH 6 et au voisinage de pH 9 un équilibre monomère-dimère qui à la précision expérimentale près, ne dépend plus de la valeur du pH, tout comme nous l'avons montré dans la partie théorique. Il ne semble pas s'agir d'une hétérogénéité de composition car cet équilibre est normalement déplacé par effet de la température comme le montre la figure 28.

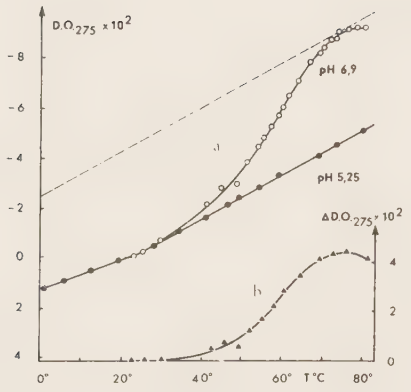


Fig. 27 - a - Variation de la densité optique à 275 mμ de la β-lactoglobuline A (c = 1,96 mg/ml) en fonction de la température à pH 5,25 et à pH 6,9.

b - Différence d'ordonnée entre les 2 courbes (a).

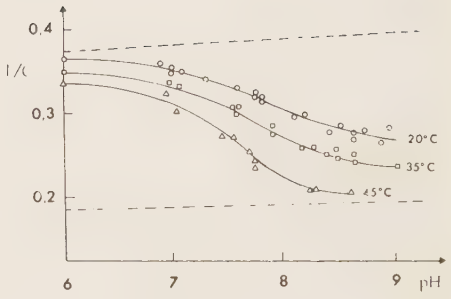


Fig. 28 - Variation de l'intensité de la lumière diffusée par la β-lactoglobuline B en fonction du pH à différentes températures - $\mu = 0,1$ - C = 0,5 10^{-4}M. (M = 35000).

(GEORGES C., GUINAND S. et TONNELAT J. (34).

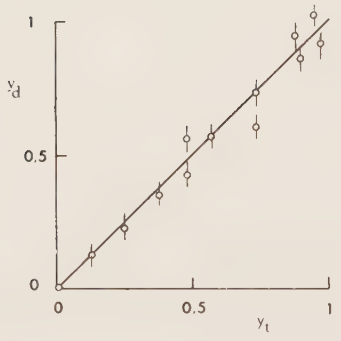


Fig. 29 - Variation du degré apparent de dissociation moléculaire, y_d, de la β-lactoglobuline B en fonction du degré apparent de transconformation, y_t, de cette protéine.

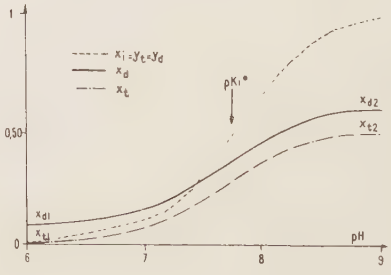


Fig. 30 - Variation de x_t, x_d et x_i ($x_i = y_t = y_d$) en fonction du pH pour la β-lactoglobuline B à 20° C, $\mu = 0,1$, C = 2.10^{-4}M.

Courbes calculées à partir des données expérimentales.

II.- DISCUSSION - APPLICATION DES DONNEES THEORIQUES

A.- TRANSCONFORMATION ET DISSOCIATION MOLECULAIRE

Le pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline, comme celui de toute autre substance peut être considéré d'après le principe de superposition optique énoncé par Vant'Hoff, comme la somme des rotations partielles caractéristiques de chacun des centres d'asymétrie qui entre dans la composition de la molécule. Il peut être utile dans certains cas d'élargir ce principe et de considérer à part et comme une grandeur additive la rotation optique associée à une isomérisation quelconque, bien que cela n'ait pas de signification physique propre puisque ce faisant nous attribuons un pouvoir rotatoire à une structure séparée de son support matériel. Néanmoins cela nous permet d'écrire que le pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline est égale à :

$$[\alpha]_{obs.} = [\alpha]_N - x_t\ [\alpha]_t - |z|\ \frac{\partial [\alpha]}{\partial z}$$

où $[\alpha]_{obs.}$ est le pouvoir rotatoire observé.

$[\alpha]_N$ est le pouvoir rotatoire spécifique de la lactoglobuline dans la conformation native (nomenclature de Tanford *et al* (1961).

$[\alpha]_t$ est la contribution au pouvoir rotatoire spécifique de la protéine, de la structure mise en jeu dans le changement de conformation.

x_t est la fraction de molécules transformées, x_t est fonction du pH (voir partie théorique page 45).

z est la charge spécifique de la protéine.

les signes négatifs indiquent qu'une certaine structure dissymétrique existant à l'état natif disparait au cours de la transition quand z et x_t augmentent.

Cette équation permet de rendre compte théoriquement des variations de pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline à toutes les longueurs d'onde en remplaçant $[\alpha]_i$ par $A_i/(\lambda^2 - \lambda_i^2)$.

Cependant les valeurs de $[\alpha]_N$, de $[\alpha]_t$ et de x_t ne peuvent être connues directement et a priori, l'expérience permet d'atteindre en première analyse la valeur $[\alpha]_N$, qui est le pouvoir rotatoire de la protéine à l'état initial, où il peut exister une proportion non négligeable, x_{t1}, de molécules transformées ; de même à l'état final la fraction de molécules transformée x_{t2}, peut être nettement inférieure à l'unité. Nous ne pouvons donc connaître que la différence de pouvoir rotatoire entre l'état initial et l'état final $[\alpha]'_t$ et le degré apparent de transconformation y_t qui nous l'avons vu est égal à :

$$y_t = \frac{x_t - x_{t1}}{x_{t2} - x_{t1}}$$

Nous pouvons donc écrire :

$$[\alpha]_{obs} = [\alpha]'_N - y_t [\alpha]'_t - z \frac{\partial [\alpha]}{\partial z}$$

Pour la β-lactoglobuline B à 20° C et $\lambda = 436\ m\mu$, à partir des valeurs obtenues p. 62 et 63, nous pouvons écrire :

$$[\alpha]_{obs} = -64° - y_t (41°) - z\ 1{,}4\ 10^4$$

Nous avons, en portant $1/[\alpha]_N$ et $1/[\alpha]_t$ en fonction de λ^2 obtenu les valeurs des constantes rotatoires que nous avons porté dans les expressions suivantes :

$$[\alpha]'_N = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_c^2} = \frac{-8{,}5\ 10^3}{\lambda^2 - (247)^2}$$

$$[\alpha]_t = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_c^2} = \frac{+\ 5\ 10^3}{\lambda^2 - (255)^2}$$

Pour exprimer la variation de la dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline en fonction du pH nous écrirons :

$$[\alpha]'_o = \frac{-8{,}5\ .\ 10^3}{\lambda^2 - (247)^2} - y_t \frac{5\ .\ 10^3}{\lambda^2 - (255)^2}$$

où $[\alpha]'_o = [\alpha]_{obs.} + z\partial [\alpha] / \partial z$.

La valeur de y_t qui varie en fonction du pH de 0 à 1 est égale au rapport :

$$y_t = \frac{[\alpha]'_o - [\alpha]'_N}{-[\alpha]'_t}$$

On peut par un raisonnement analogue montrer que la variation du degré apparent de dissociation moléculaire y_d, qui est égal nous l'avons vu à $(x_d - x_{d1})/(x_{d2} - x_{d1})$, correspond expérimentalement à la variation de la masse moléculaire moyenne M au cours de la transition ou à toute autre grandeur qui lui serait proportionnelle.

$$y_d = \frac{\overline{M} - \overline{M}_1}{\overline{M}_2 - \overline{M}_1}$$

M_1 et M_2 étant respectivement la masse moléculaire moyenne au début et à la fin de la transition.

Remarquons qu'il est ici possible, en déplaçant complètement l'équilibre de dimérisation par effet de la température par exemple comme l'ont fait C. Georges et S. Guinand, d'obtenir la valeur de la masse moléculaire M de la protéine monomère. On peut donc dans ce cas obtenir la valeur de la fraction dissociée x_d :

$$x_d = 1 - \frac{\overline{M} - M}{M}$$

A partir des résultats obtenus par dispersion rotatoire et de ceux obtenus par diffusion de la lumière nous avons calculé les valeurs de y_t et y_d, puis comparé les différentes valeurs de ces deux variables en fonction du pH pour mettre en évidence une relation possible entre y_t et y_d.

Nous avons porté sur un graphique, figure 29, les valeurs de y_d en fonction des valeurs de y_t obtenues dans des conditions physico-chimiques semblables. L'ensemble des points est groupé sur une droite de pente unité, ce qui signifie que $y_t = y_d$.

Nous remarquerons que ce résultat en vérifiant expérimentalement une conséquence déduite du modèle théorique d'interactions entre une dimérisation associée à une transconformation et à une ionisation, nous apporte la preuve de l'existence d'un tel mécanisme dans la β-lactoglobuline.

Cependant, un point reste à préciser, c'est l'effet de la charge électrique de la protéine donc des répulsions électrostatiques sur l'équilibre de dissociation moléculaire et de transconformation de la β-lactoglobuline au-dessus du point isoélectrique.

Il semble très difficile expérimentalement de mesurer la grandeur de cet effet aussi en est-on réduit à le calculer à partir des données du titrage électrométrique et en faisant un certain nombre d'hypothèses. Ce qui revient à calculer *l'énergie de répulsion électrostatique entre deux sphères jointives indéformables et uniformément chargées* comme l'indiquent Timasheff et Townend (1961) qui utilisent pour ce calcul l'équation de Verwey et Overbeek (1948).

En considérant que la charge de la protéine est nulle à pH 5,2 à 20°C et $\mu = 0,1$, nous avons calculé de la même manière :

Premièrement : la variation d'enthalpie libre due à toutes les répulsions électrostatiques, Δ (ΔGe).

Deuxièmement : la variation d'enthalpie libre relative aux charges qui jouent un rôle non spécifique dans la dissociation et la transconformation de la protéine, c'est-à-dire, relative à l'ensemble des charges à un pH donné moins les charges dues à la fraction dissociée des deux COOH anormaux impliqués directement dans les phénomènes de dissociation moléculaire et de transconformation, Δ (ΔGe').

Les valeurs obtenues dans les deux cas sont les suivantes :

pH	6	7,5	7	7,5	8	8,5	9
$2\overline{Z}$	-5,5	-8	-10	-12,6	-15	-17	-19
Δ (ΔGe) Kcal/mole	-0,1	-0,2	- 0,3	- 0,6	- 0,8	- 1	- 1,3
$2\overline{Z}$-2(αCOOH)	-5,5	-7,8	- 9,5	-11,6	-13,5	-15,2	-17
Δ (ΔGe') Kcal/mole	-0,1	-0,18	- 0,25	- 0,45	- 0,65	- 0,8	- 1

Remarquons que dans la zone de pH comprise entre 6,5 et 8,5 qui couvre 95 % de la variation de y_t et y_d, la variation de Δ (ΔGe) n'est que de -0,8 Kcal/mole-dimère, valeur de laquelle il faut encore retrancher l'énergie de répulsion électrostatique attribuée aux deux carboxyles anormaux, qui interviennent par leur ionisation de façon spécifique dans le phénomène de transconformation et de dissociation, on obtient alors pour la variation de Δ (ΔGe') une valeur de -0,6 Kcal/mole-dimère. Cette valeur attribuée à une variation de la charge qui passe de 8 à 15 unités correspond à l'ionisation de 3,5 groupes par protomère, trois de ces groupes sont parfaitement déterminés, ce sont : les 2 imidazoles et le groupe NH_3^+ terminal de la molécule. Or nous savons qu'un des imidazoles est l'avant dernier résidu de l'extrémité C terminale. On peut penser que ces groupes terminaux, étant donné leur position, doivent posséder un grand degré de liberté ce qui amoindrirait encore les répulsions électrostatiques dues à ces charges sur des supports souples.

Enfin les deux meilleures preuves expérimentales en faveur du rôle minime des répulsions électrostatiques entre pH 6 et 9 dans le phénomène de dimérisation et de transconformation de la β-lactoglobuline sont sans doute :

1.- Le fait que la courbe de variation de $\bar{M}$ marque un palier au voisinage de pH 8,5 à 20°C alors que la charge de la protéine ne cesse de s'accroître et que la dissociation est loin d'être complète.

2.- Le fait que l'augmentation de force ionique qui réduit considérablement les intéractions électrostatiques ne réduise que peu la fraction de molécules dissociées ; au contraire la dissociation est augmentée au voisinage de pH 6 (42).

B.- VARIATION DU DEGRE DE TRANSCONFORMATION APPARENT y_t EN FONCTION DU pH

Le degré apparent de transconformation y_t varie avec la valeur du pH. Nous avons obtenu pour cette variation une courbe qui est une sigmoïde de forme dissymétrique (Fig. 31a). Si nous utilisons, comme le propose Wyman, la représentation de Hill, $\log y_t/(1 - y_t)$, on obtient en fonction du pH une droite de pente unité au-dessous de pH 7,4, au-delà de ce pH comme le montre la figure 31 c, la pente devient plus forte.

L'aspect de cette courbe est tout à fait conforme à celui que l'on doit s'attendre à trouver dans le cas d'une transconformation liée à une dissociation moléculaire et à l'ionisation d'un groupe spécifique par unité protomère. (Cf. chap. IV, page 45).

Nous savons que dans le cas d'un modèle semblable le degré apparent de transconformation y_t est identique au degré apparent de dissociation moléculaire y_d et à la fraction ionisée x_i du groupe impliqué dans le changement de structure : $y_t = y_d = x_i$.

En particulier la variation y_t en fonction du pH est identique à la courbe de titrage du groupe anormal. Le pK apparent de ce groupe en milieu acide, $pK_i^*{}_a$, obtenu à partir de la portion de courbe comprise entre pH 6 et 7,4, est égal à 7,7 et d'après la relation :

$$K = K_{int.}\, e^{2w\bar{Z}}, \qquad w = 0{,}039$$

la valeur intrinsèque de $pK_i^*{}_a = 7{,}3$ à 20°C et pour $C = 2\ 10^{-4}$M.

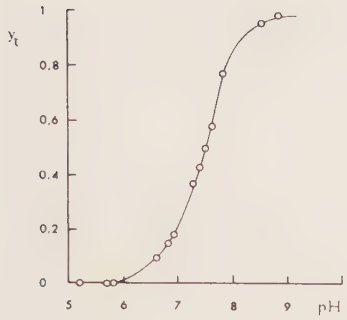


Fig. 31a - Variation du degré apparent de transconformation, y_t, de la β-lactoglobuline B en fonction du pH à 20°C.

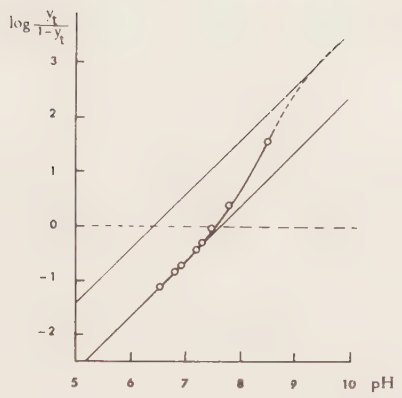


Fig. 31c - Représentation de Hill : variation de $\log \frac{y_t}{1 - y_t}$ en fonction du pH.

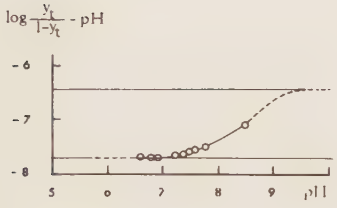


Fig. 31b - Variation du pK apparent, pK_i^*, en fonction du pH.

Au-dessus de pH 7,4 la courbe, nous l'avons déjà dit, devient asymétrique car la valeur de pK_i^* décroît quand la valeur du pH augmente pour atteindre en milieu basique une valeur limite, $pK_{i\,b}^*$, que la précision de nos expériences ne permet d'obtenir directement à partir de nos données expérimentales.

Cependant sachant que :

$$pK_i^*{}_a = pK_{i2} - \log \frac{1 + K_{t4}}{1 + K_{t2}} - \log x_{d1}$$

et

$$pK_i^*{}_b = pK_{i2} - \log \frac{1 + K_{t4}}{1 + K_{t2}} + \log x_{d2}$$

nous pouvons écrire :

$$pK_i^*{}_b = pK_i^*{}_a + \log x_{d1} + \log x_{d2}$$

Or nous avons vu que par diffusion de la lumière, nous pouvions atteindre expérimentalement la valeur de la fraction de molécules dissociées à l'état initial et à l'état final x_{d1} et x_{d2}. Nous pouvons donc connaître la valeur de $pK_i^*{}_b$:

$$pK_i^*{}_b = 6{,}0 \text{ à } 20°C,\ C = 2\ 10^{-4}M$$

(Les symboles employés ici sont ceux définis dans la partie théorique).

Le fait de connaître la valeur de $pK_i^*{}_a$ et $pK_i^*{}_b$ qui sont les limites de variation de pK_i^* en fonction du pH pour une température et une concentration protéique donnée, nous permet d'obtenir par interpolation la courbe complète de variation de pK_i^* comme le montre la figure 31c.

D'autre part, connaissant la valeur de $pK_i^*{}_a$ et $pK_i^*{}_b$, nous pouvons calculer *l'énergie d'interaction* entre le phénomène de dimérisation et l'ionisation du groupe anormal. L'énergie d'interaction peut être définie comme la différence d'enthalpie libre $\Delta(\Delta G)$ entre ΔG d'un phénomène en présence d'intéractions et ΔG du même phénomène sans interaction. D'après l'étude des modèles, nous savons que la variation du pK_i apparent au cours du titrage du groupe impliqué dans le changement de structure, est essentiellement due au phénomène de dimérisation. Cette énergie d'intéraction est égale à :

$$2{,}3\ RT\ (pK_i^*{}_a - pK_i^*{}_b) \text{ soit à } 20°C\ \ \Delta G = 1{,}7 \text{ Kcal/mole.}$$
$$\text{à } 45°C\ \ \Delta G = 1{,}1 \text{ Kcal/mole.}$$
$$\Delta H = 9 \text{ Kcal/mole.}$$

C.- TRANSCONFORMATION REELLE DE LA β-LACTOGLOBULINE

Nous avons vu plus haut que le pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline corrigé de l'effet de charge pouvait s'écrire :

$$[\alpha]'_o = [\alpha]_N - x_t\,[\alpha]_t$$

ou

$$[\alpha]'_o = [\alpha]_N - y_t\,[\alpha]'_t$$

et seuls les termes de la deuxième équation étaient directement mesurables.

Cependant, de même que l'on peut, dans le cas de la dimérisation, déplacer de façon presque complète l'équilibre vers la forme monomère, ce qui permet d'obtenir la valeur de I/C caractéristique du monomère et par suite de connaître la valeur de x_d, on peut de la même manière déplacer l'équilibre de transconformation et obtenir ainsi les valeurs du pouvoir rotatoire vrai, pour la protéine ayant subi la transconformation ($x_t = 1$) et pour la protéine à l'état natif quand la fraction de molécules transformées, x_t, tend vers zéro. On peut donc connaître ainsi la valeur de $[\alpha]_N$ et $[\alpha]_t$ puis les valeurs de x_t d'après la relation :

$$x_t = \frac{[\alpha]'_o - [\alpha]_N}{-[\alpha]_t}$$

Les courbes de la figure 13 qui représentent la variation de $[\alpha]'_o$ en fonction du pH à différentes températures et pour $\lambda = 436\ m\mu$ montrent que $[\alpha]'_o$ semble atteindre un palier pour $[\alpha]'_o = 140°$ à pH 7 et à 80°C. Entre pH 6 et 5 quelques mesures ont montré que le pouvoir rotatoire ne variait que très peu par abaissement de la température au-dessous de 20°C et que l'on pouvait considérer que la valeur de $[\alpha]_N$ à 20°C était égale à 65°,

$$x_t = \frac{[\alpha]_o + 65°}{-75}$$

ce qui nous permet de connaître la valeur de x_t au début de la transition ou x_{t1} et la valeur de x_t à la fin de la transition ou x_{t2}.

A 20°C nous obtenons :

$$x_{t1} = \text{très petit, non mesurable} \quad x_{t2} = 0,5$$

de la même façon nous pouvons connaître la valeur de x_{d1} et de x_{d2} dans des conditions thermodynamiques semblables :

$$x_{d1} = 0,08 \qquad x_{d2} = 0,6$$

A 45°C ces valeurs deviennent :

$$x_{t1} = 0,07 \qquad x_{t2} = 0,6$$

$$x_{d1} = 0,2 \qquad x_{d2} = 0,9$$

Nous ne devons cependant nous faire aucune illusion quant aux valeurs réelles de x_t, que nous considérerons comme une élévation semi-quantitative, car il est fort possible que $[\alpha]_N$ et $[\alpha]_t$ varient quelque peu sous l'influence de la température et indépendamment de la valeur du pH. Les valeurs de x_{t2} sont des valeurs minimales et celles de x_{t1} sont des valeurs maximales. Ces valeurs bien que peu précises seront néanmoins fort utiles pour évaluer les constantes d'équilibre du système.

D.- DETERMINATION DE LA VALEUR DES CONSTANTES D'EQUILIBRE INTRINSEQUE

Notre but sera ici d'essayer d'établir la valeur des constantes d'équilibre intrinsèque de chacune des différentes réactions de ce système où existent des interactions réciproques entre trois phénomènes de nature différente. La valeur de ces constantes d'équilibre doit être indépendante de la valeur du pH et de la concentration protéique de la solution.

Nous avons vu dans l'étude théorique du modèle N° 3 (page 45), qui semble correspondre le mieux au mécanisme existant réellement dans le cas de la β-lactoglobuline, qu'il y a 12 constantes d'équilibre reliant entre elles 8 formes distinctes de la protéine. Cependant nous savons qu'il suffit de déterminer la valeur de 7 constantes indépendantes pour définir complètement le système. La valeur des autres constantes est reliée à la valeur des premières par un grand nombre de relations.

Il faut donc pour atteindre le but que nous nous sommes fixés, connaître au moins 7 données expérimentales quantitatives sur l'état d'équilibre de ce système. Cependant s'il existe, pour la protéine que nous étudions dans des conditions de températures déterminées, des relations supplémentaires entre les constantes d'équilibre, cela diminue le nombre de constantes indépendantes et partant le nombre de données expérimentales nécessaires à l'étude de ce système.

Pour la β-lactoglobuline B à 20°C $\mu = 0,1$, nous connaissons :

$$x_{t1} = \text{? très faible} \qquad x_{t2} = 0,5$$

$$x_{d1} = 0,08 \qquad x_{d2} = 0,6 \qquad \text{pour } C = 2\ 10^{-4}\ M$$

$$pK_i{}^*{}_a = 7,3$$

et nous allons essayer de démontrer que l'on peut écrire les trois relations supplémentaires suivantes :

$$(a)\ I + \overline{K}_{t1}^{\,2} \simeq (1 + K_{t2})^2 \qquad (b)\ \overline{K}_{t3}^{\,2} \simeq K_{t4}$$

$$(c)\ pK_{i4} \simeq pK_{i4} = 4{,}6$$

Démontrer l'égalité (a) revient à démontrer que K_{t1} et $K_{t2} \ll 1$ ce qui est évident pour K_{t1} puisque l'on sait qu'à pH 6 la protéine est presque entièrement à l'état dimère et dans la conformation native (x_{t1} et x_{t2} très petit). Par contre pour évaluer K_{t2}, le nombre de molécules monomères à pH 6 est trop petit pour que l'on sache si celles-ci sont dans la conformation native ou si au contraire un nombre important d'entre elles ont subi la transconformation. Cependant on peut savoir que K_{t2} est petit en remarquant que l'augmentation de la charge électrique de la protéine au-dessous du point isoélectrique provoque une augmentation importante de la concentration des monomères (MH) sans pour autant entraîner une variation importante du pouvoir rotatoire. Nous avons donc le droit d'écrire $1 + K_{t1}^2 \simeq (1 + K_{t2})^2 \simeq 1$.

Nous avons été amenés à écrire l'équation (b) par le fait qu'en milieu alcalin, pH 8,9 nous n'avons observé aucun effet de la dilution sur la valeur du pouvoir rotatoire spécifique de la β-lactoglobuline. Ce qui permet de penser que la fraction pondérale de dimère transformé est peu différente de la fraction pondérale de monomère transformé, ce qui peut s'écrire :

$$\frac{(D'')}{(D) + (D'')} \simeq \frac{(M')}{(M) + (M')}$$

et d'où l'on tire l'expression (b).

Conformément aux conceptions de Tanford on peut penser que le carboxyle impliqué dans le changement de structure de la protéine passe au cours de la transconformation, de l'intérieur hydrophobe de la protéine où sa constante d'ionisation est très faible à la surface au contact du solvant aqueux où sa constante d'ionisation retrouverait la valeur caractéristique des carboxyles de la β-lactoglobuline. Dans la mesure où cette hypothèse est justifiée dans le cas du monomère et du protomère de β-lactoglobuline, nous avons le droit d'écrire :

$$pK_{i3} \simeq pK_{i4} = 4{,}6$$

Nous avons donc maintenant tous les éléments nécessaires pour déterminer par simple application des relations théoriques (3,14) (3,16) (3,18) à (3,20) et (3,1) à (3,5), la valeur des douze constantes d'équilibre du système.

Soit :

4 constantes d'ionisation

4 constantes de transconformation

et 4 constantes de dissociation moléculaire.

Voici les valeurs obtenues :

Constantes d'ionisation du COOH anormal.

Dimère non transformé : $\overline{pK}_{i1} = 7,4$ ionisation coopérative
" transformé : $\overline{pK}_{i3} = 4,6$
Monomère non transformé : $pK_{i2} = 6,5$
" transformé : $pK_{i4} = 4,6$

Constantes de transconformation :

Dimère portant 2 COOH anormaux : $K_{t1}^2 = 10^{-3}$
" " 2 COO^- : $K_{t3}^2 = 1$
Monomère portant 1 COOH anormal : $K_{t2} = 10^{-2}$
" " 1 COO^- : $K_{t4} = 1$

Constantes de dissociation moléculaire :

Protéine non transformée, 2 COOH : $K_{d1} = 3\ 10^{-6}$ M
" transformée " : K_{d3}
" non transformée, 2 COO^- : K_{d2} } $= 2\ 10^{-4}$ M
" transformée, 2 COO^- : K_{d4}

E.- RELATIONS ENTRE LA TEMPERATURE ET LES CONSTANTES APPARENTES D'EQUILIBRE

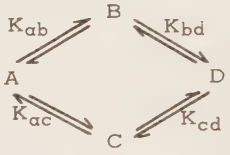
1.- ASPECT GENERAL DU PROBLEME

Les valeurs des constantes d'équilibre que nous venons de déterminer, sauf en ce qui concerne les constantes d'ionisation, correspondent en général à une série d'équilibres complexes.

En effet, l'équilibre de transconformation ou de dissociation moléculaire qui correspondent au passage rapide et réversible d'une forme moléculaire définie à une autre forme moléculaire ne sont pas des réactions simples ; d'après ce que l'on sait de la structure des protéines globulaires en général et de la structure de la β-lactoglobuline en particulier, nous pouvons penser que ces réactions impliquent nécessairement la rupture d'un certain nombre de liaisons hydrogènes, l'éloignement ou le rapprochement de charges électriques et le transfert de groupes hydrophobes de l'intérieur de la protéine à sa surface au contact du solvant aqueux. Nous l'avons mis en évidence dans le cas de la tyrosine car le transfert s'accompagne d'une modification de spectre. Chaque rupture de liaison hydrogène ou chaque transfert d'amino-acide constitue un équilibre élémentaire et quel que soit l'ordre dans lequel se succèdent ces équilibres, la valeur de la constante d'équilibre apparente entre deux états parfaitement définis séparés par une série d'équilibres quelconque est toujours égale au produit des constantes d'équilibres intrinsèques des étapes intermédiaires quel que soit le chemin parcouru. L'étude thermodynamique de cet équilibre global est la

même que celle d'un équilibre simple. Cependant s'il existe à l'état initial et à l'état final plusieurs formes en équilibre, l'étude thermodynamique de l'équilibre de passage des formes initiales aux formes finales est plus complexe que dans le cas précédent. Prenons deux exemples simples :

Considérons d'abord l'équilibre de passage de la forme A à la forme D par l'intermédiaire des formes B et C tel que le présente le schéma d'équilibre ci-dessous :



La constante d'équilibre de la transition $A \rightleftarrows D$ est égale à :

$$(A)/(D) = K_{apparent} = K_{ab} \cdot K_{bd} \quad (5,1)$$

ou encore $= K_{ac} \cdot K_{cd}$

La variation d'enthalpie libre ΔG° est égale à la somme des enthalpies libres correspondant à chacune des étapes :

$$\Delta G^\circ = - RT \log K_{ab} - RT \log K_{bd}$$

D'une façon générale $\Delta G^\circ = \Sigma \Delta G_i$ lorsqu'il y a équilibre entre une seule forme initiale et une seule forme finale. ΔG° peut encore s'écrire :

$$\Delta G^\circ = \Sigma \Delta H_i^\circ - T \Sigma \Delta S_i^\circ$$

La variation d'enthalpie de cet équilibre est égale à la somme des variations d'enthalpie de chaque équilibre intermédiaire, il existe donc une relation linéaire entre log Kapparent et $1/T$ dans un intervalle modéré de température.

Si nous considérons maintenant l'équilibre de transition entre les formes initiales A et B et les formes finales C et D, le schéma d'équilibre étant le même que celui présenté ci-dessus, nous obtenons pour la constante apparente d'équilibre de la transition (A, B → C, D) la valeur suivante :

$$\frac{(C) + (D)}{(A) + (B)} = K_{apparent} = K_{ac} \frac{1 + K_{cd}}{1 + K_{ab}} \quad (5,2)$$

Nous pourrions choisir bien d'autres exemples où il existe plus d'une forme initiale ou finale en équilibre ; dans tous les cas la constante d'équilibre apparente entre ces groupes de conformations n'est plus un simple produit de constantes, c'est une expression souvent complexe comprenant des produits et des sommes de constantes.

En conséquence la représentation graphique de $\Delta G^\circ/T$ en fonction de $1/T$ n'est plus une droite et partant la dérivée de cette fonction, ΔH°, n'est pas une constante, même si les ΔH de chaque transformation peuvent être considérés comme constants.

Essayons de voir dans le deuxième exemple comment varie log $K_{app.}$ en fonction de $1/T$.

Supposons les réactions endothermiques : A basse température les valeurs des constantes d'équilibres deviennent très inférieures à l'unité et K_{app} tend alors vers K_{ac} dans l'Eq. (5,2). A haute température les valeurs des constantes d'équilibres tendent vers l'infini et $K_{app.}$ tend vers $K_{ac} \cdot K_{cd}/K_{ab}$, or cette expression est égale K_{bd} car $K_{ac}\ K_{cd} = K_{bd}$ étant donné que les deux chemins pour passer de A à D sont équivalents.

Donc, en fonction de 1/T, la variation de log $K_{app.}$ est une courbe sigmoïde qui a pour asymptote à basse température la courbe de variation de log K_{ac} et à haute température la courbe de variation de log K_{bd} en fonction de 1/T.

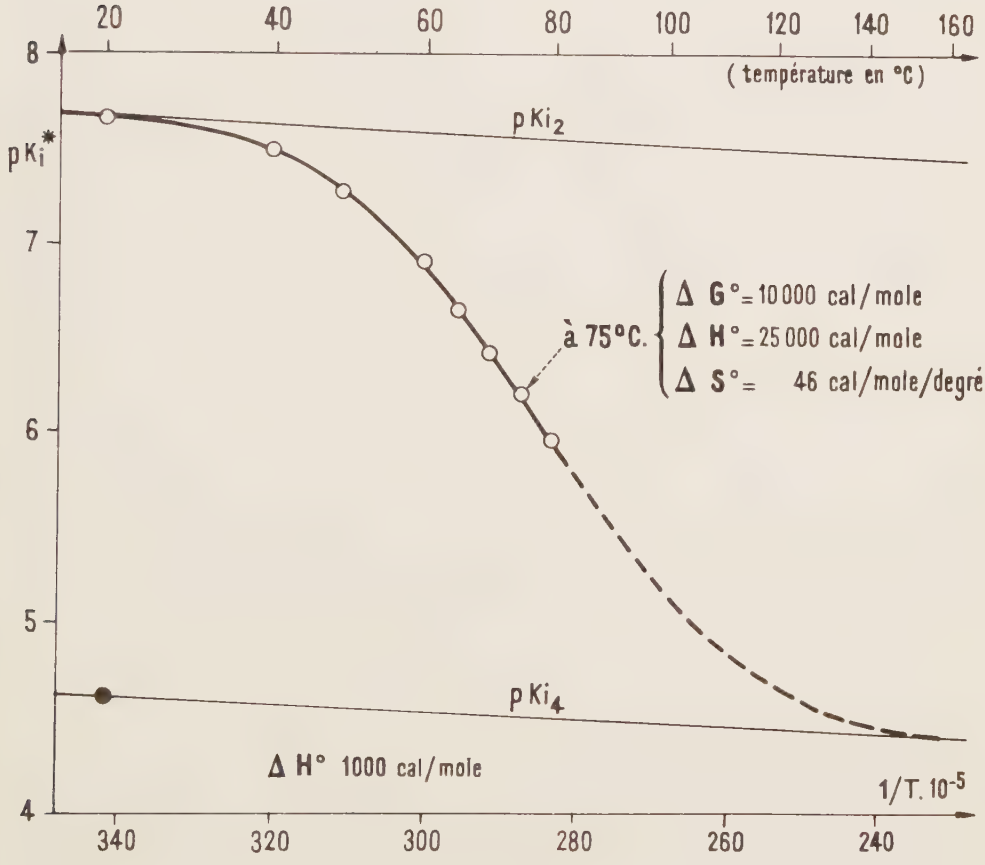


Fig. 32 - Variation du pK apparent d'ionisation, pK_i^*, du groupe carboxylique anormal de la β-lactoglobuline en fonction de 1/T.

2.- APPLICATION A LA β-LACTOGLOBULINE

Parmi les trois constantes apparentes d'équilibre, K_i^*, K_t^* et K_d^* de l'équilibre complexe de la β-lactoglobuline, nous n'étudierons en fonction de la température que les variations de la constante apparente d'ionisation K_i^*, car en absence d'interaction une ionisation est un phénomène simple, de plus la valeur de pK_i^* nous est donnée à différentes températures, avec une bonne précision, par le point d'inflexion des courbes de la figure 22.

Les résultats obtenus sont portés sur la figure 32, qui représente la variation du pK apparent, pK_i^*, du groupe carboxylique anormal en fonction de 1/T, pour des températures comprises entre 20 et 80°C.

Au voisinage de 20°C la valeur de pK_i^* (7,7) ne varie que très peu avec la température, le carboxyle anormal semble posséder une valeur de $\Delta H°$ caractéristique des carboxyles : $\Delta H° = 1000$ cal/mole.

Aux températures plus élevées la variation de pK_i^* en fonction de 1/T devient beaucoup plus forte et correspond à une valeur de $\Delta H° = 25\,000$ cal/mole. Cependant la valeur de pK_i^* a une limite, en aucun cas elle ne peut atteindre une valeur inférieure au pK normal des carboxyles à la même température. En effet, à la température pour laquelle $pK_i^* = pK_{normal}$, il n'existe plus de transconformation la molécule protéique est entièrement transformée à tous les pH.

D'après la formule (3,16) :

$$pK_i^* = pK_{i2} - \log \frac{1 + K_{t4}}{1 + K_{t2}} - \log x_{d1}$$

les réactions étant exothermiques, lorsque la température croît :

x_{d1} tend vers 1 $\qquad$ $\log x_{d1}$ tend vers 0

$$\log \frac{1 + K_{t4}}{1 + K_{t2}} \text{ tend vers } \log \frac{K_{t4}}{K_{t2}}, \text{ et l'on obtient alors :}$$

$$pK_i^* = - \log K_{i2} \cdot \frac{K_{t4}}{K_{t2}}$$

et d'après l'équation (3,5) : $pK_i^* = pK_{i4}$

Nous pouvons donc, connaissant la valeur vers laquelle doit tendre asymptotiquement pK_i^* aux températures élevées, extrapoler l'autre partie de la courbe.

Nous constatons alors qu'il faudrait atteindre la température de 160°C pour que le carboxyle anormal soit entièrement démasquer et que la protéine n'existe plus qu'à l'état transformé à tout pH.

Le point de demi-transition se situe à 75°C, à cette température les constantes thermodynamiques relatives à l'équilibre apparent d'ionisation du carboxyle anormal sont les suivantes :

$$\Delta G^\circ = 10000 \text{ cal/mole}$$
$$\Delta H^\circ = 26000 \text{ cal/mole}$$
$$\Delta S^\circ = 46 \text{ cal/mole/degré}$$

A la même température, 75°C, les constantes thermodynamiques relatives à l'ionisation du carboxyle normal seraient les suivantes :

$$\Delta G^\circ = 7200 \text{ cal/mole}$$
$$\Delta H^\circ = 1000 \text{ cal/mole}$$
$$\Delta S^\circ = -18 \text{ cal/mole/degré.}$$

Normalement l'ionisation des acides carboxyliques varie très peu avec la température et l'enthalpie libre d'ionisation ΔG°, est essentiellement due à une grande diminution de l'entropie. Cette diminution d'entropie traduit une diminution du nombre de degrés de liberté du système en solution et est généralement attribuée à l'apparition de deux nouvelles charges qui organisent le solvant aqueux. Dans le cas de l'ionisation du carboxyle anormal nous voyons au contraire qu'il y a une forte augmentation d'entropie, l'organisation du solvant compense peu la désorganisation de la molécule que provoque cette ionisation.

Ces données thermodynamiques soulignent le caractère anormal de l'ionisation du carboxyle impliqué dans le changement de structure de la protéine et viennent étayer les résultats que nous avons obtenus par spectropolarimétrie et par spectrophotométrie en montrant que l'ionisation du carboxyle anormal est nécessairement liée à une réorganisation de la molécule de β-lactoglobuline.

CHAPITRE V

TRANSFORMATION REVERSIBLE DE LA β-LACTOGLOBULINE ASSOCIEE A LA CHELATION D'UN ION CUIVRIQUE PAR DEUX IMIDAZOLES

L'étude de la fixation de l'ion cuivrique sur la β-lactoglobuline avait été entreprise pour essayer de déterminer la nature du groupe ionisable impliqué dans la transconformation $N \rightleftharpoons R$, alors qu'il n'existait pas encore de preuve évidente en faveur du rôle joué par le carboxyle anormal. Le changement de structure de la β-lactoglobuline se produisant dans la zone de pH où sont titrés les imidazoles, nous voulions savoir, en substituant l'ion Cu^{++} à l'ion H^+, si ce groupe n'était pas associé directement à ce changement de conformation. Nous savons actuellement qu'il ne peut en être ainsi puisque les deux imidazoles de la β-lactoglobuline ne présentent pas de pK anormal. Néanmoins les résultats obtenus montrent que le complexe imidazole-cuivre dans la β-lactoglobuline ne présentent pas de pK d'ionisation anormal. Néanmoins les résultats obtenus montrent que le complexe imidazole-cuivre dans la β-lactoglobuline possède une constante de dissociation anormale et que la formation de ce complexe est associée à une transconformation de la molécule.

I.- GENERALITES

Lorsque l'on ajoute des ions cuivre à une solution de protéines, ces ions se répartissent entre les groupes sulfhydriles, imidazoles, carboxyliques et aminés en fonction de leur affinité pour ces différents ligands. Ces groupes ont également une forte affinité pour les protons, il y a donc compétition entre les ions H^+ et les ions Cu^{++} pour la fixation sur un même site.

Cette compétition peut être représentée par les deux équilibres suivant :

$$AH^+ \rightleftharpoons A + H^+ \qquad K_H = \frac{(A)\,(H^+)}{(AH^+)} \qquad (1)$$

$$A + Cu^{++} \rightleftharpoons ACu^{++} \qquad K_{Cu} = \frac{(A)\,(Cu^{++})}{(ACu^{++})} \qquad (2)$$

Les constantes intrinsèques de dissociation de l'ion H^+ et de l'ion Cu^{++} sont respectivement K_H et K_{Cu}.

Dans la mesure où l'on connaît la valeur de pK_H et de pK_{CU} relative à chacun des groupes susceptibles de fixer l'ion cuivre, on peut déterminer quelle doit être l'activité du métal libre à la demi-saturation par ce métal d'un groupe donné, c'est-à-dire quelle doit être la valeur de $(Cu^{++})_{1/2}$ pour que l'on ait :

$$(ACu^{++}) = (AH^+) + (A)$$

en combinant les équations (1) et (2), on obtient :

$$(Cu^{++})_{1/2} = K_{Cu}\,(1 + H/K_H)$$

ou encore par transformation en cologarithmes décimaux :

$$pCu_{1/2} = pK_{Cu} - \log\,(1 + H/K_H) \qquad (3)$$

La relation (3) appelle plusieurs remarques :

On voit en effet que lorsque les valeurs de pH sont suffisamment faibles pour que l'on puisse considérer $(H^+)/K_H \gg 1$, on obtient :

$$pCu_{1/2} = pK_{Cu} + pH - pK_H \qquad (4)$$

ce qui indique que $pCu_{1/2}$ augmente linéairement avec la valeur du pH. Pour les fortes valeurs de pH quand $(H^+)/K_H \ll 1$, il n'y a plus compétition entre l'ion Cu^{++} et l'ion H^+ pour le site considéré et la fixation de Cu^{++} ne dépend plus de la valeur de pH et l'on a alors :

$$pCu_{1/2} = pK_{Cu} \qquad (5)$$

Dans le premier cas, en milieu acide, la fixation d'un ion métallique par un ligand simple provoque un déplacement de l'équilibre de dissociation acide-base de ce ligand qui se traduit par la libération d'un ion H^+ par ion Cu^{++} fixé.

Dans le second cas, en milieu alcalin, le ligand ne porte plus de proton et la fixation d'un ion Cu^{++} par ce ligand ne se traduit plus par une variation de pH.

Entre ces deux cas limites, dans la zone de pH où $(H^+)/K_H \neq 1$, la fixation d'un ion Cu^{++} déplace un nombre de protons inférieur à 1 et égal à la fraction de groupe ligand sous la forme acide $(1 - \alpha)$.

$$(\alpha = \frac{(A)}{(A) + (AH)} \text{ ou encore } \alpha = [1 + (H^+)/K_H]^{-1} \qquad (6)$$

pour une valeur de pH donnée la valeur de α est constante, elle ne dépend pas du nombre d'ions Cu^{++} fixés).

II.- ETUDE THEORIQUE DE LA FIXATION DES IONS CUIVRE PAR LA β-LACTOGLOBULINE

Il est possible de savoir a priori comment doivent se répartir les ions Cu^{++} sur les différents sites de fixation de la β-lactoglobuline quand le nombre d'ions Cu^{++} n'est pas en excès puisque le pK_H et le nombre des différents groupes ionisables de cette protéine sont connus et d'autre part, d'après l'étude de composés modèles (74) nous pouvons estimer la valeur du pK_{Cu} relatif à ces mêmes groupes.

Nous avons ainsi pour la β-lactoglobuline B (M = 18 000) :

Nature des sites	thiol	imidazole	carboxyle		amine	
Nombre de sites	1	2	25	1	14	1
pK_H	(9)	6,9	4,6	3,7	10	7,9
pK_{Cu}	10	4,36	2,16		4,15	

A partir de ces valeurs nous avons calculé l'affinité apparente de ces ligands pour l'ion Cu^{++} en fonction du pH. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 33 où nous avons porté, pour chaque type de site, la variation de $pCu_{1/2}$ en fonction du pH.

Nous remarquerons sur ce diagramme (figure 33) que le groupe thiol, quel que soit le pH de la solution, devrait fixer en priorité les ions Cu^{++} si la valeur du pK_H de ce groupe était normale.

Remarquons également que les groupes aminés bien qu'ayant un pK_{Cu} voisin de celui des imidazoles ne présentent qu'une affinité très faible pour les ions cuivre au-dessous de pH 8 en raison de la forte affinité des groupes aminés pour les ions H^+.

En milieu acide les groupes carboxyliques ont une affinité pour les ions cuivre très voisine de celle des groupes imidazoles. Dans cette zone de pH la fraction de sites occupés par le métal sera peu différente pour chacun de ces deux types de ligand, cependant le nombre d'ions cuivre fixés par les carboxyles sera, en raison de leur nombre, douze fois plus grand que le nombre d'ions cuivre fixés par les imidazoles.

Nous voyons la nécessité d'introduire des paramètres supplémentaires qui sont : le nombre total de sites de même espèce, n_i, le nombre moyen de sites de même espèce occupés par le métal $\bar{\nu}_i$, et le rapport du nombre de sites occupés au nombre de sites libres $\bar{\nu}_i/(n_i - \bar{\nu}_i)$.

D'après les relations (1) et (2), on obtient :

$$\frac{\bar{\nu}_i}{n_i - \bar{\nu}_i} = \frac{(Cu^{++})}{K_{Cu}} \frac{1}{1 + (H^+)/K_H} = K_{Cu}^{-1} \cdot \alpha_i \cdot (Cu^{++}) \qquad (7)$$

Pour les différents sites de la β-lactoglobuline nous avons donc :

Thiol : $$\frac{\bar{\nu}_1}{1 - \bar{\nu}_1} = 10^{10} \cdot \alpha_1 (Cu^{++}) \qquad (8_a)$$

Imidazole : $$\frac{\bar{\nu}_2}{2 - \bar{\nu}_2} = 10^{4,36}\ \alpha_2\ (Cu^{++}) \qquad (8_b)$$

Carboxyle : $$\frac{\bar{\nu}_3}{24 - \bar{\nu}_3} = 10^{2,16}\ \alpha_3\ (Cu^{++}) \qquad (8_c)$$

Amine $$\frac{\bar{\nu}_4}{1 - \nu_4} = 10^{4,15}\ \alpha_4\ (Cu^{++}) \qquad (8_d)$$

Amine : $$\frac{\nu_5}{12 - \bar{\nu}_5} = 10^{4,15}\ \alpha_4\ (Cu^{++}) \qquad (8_e)$$

Nous pouvons alors calculer le nombre moyen d'ions Cu^{++} fixés par chacun des différents types de site de la β-lactoglobuline en fonction de (Cu^{++}) et à un pH donné.

Il est également possible, connaissant la concentration molaire de la protéine, (P), de calculer la répartition des ions Cu^{++} sur la macromolécule protéique en fonction de la concentration totale en ions cuivre $(Cu^{++})_t$ à un pH donné utilisant la relation suivante :

$$(Cu^{++})_t = (Cu^{++}) + (P)\ (\bar{\nu}_1 + \bar{\nu}_2 + \bar{\nu}_3 + \bar{\nu}_4 + \bar{\nu}_5) \qquad (9)$$

Cependant la résolution de cette équation, où ν_1, ν_2, ν_3, etc... seraient tirés des équations précédentes, n'est pas facile et l'on est réduit généralement, si l'on ne possède pas de calculateur électronique, à chercher des approximations simplificatrices.

Nous avons supposé jusqu'ici que toutes les constantes K_{Cu} étaient connues ; supposons maintenant que cela ne soit pas et que l'on veuille connaître, par exemple, la valeur de K_{Cu} relative à la fixation du cuivre sur les groupes imidazoles de la β-lactoglobuline alors que nous ne connaissons pas la valeur de pCu. Nous avons alors une inconnue de plus, il nous faut donc une relation supplémentaire, qui peut nous être donnée par le nombre moyen de protons déplacés, $\bar{H}_d^+$, par fixation de Cu^{++} sur la molécule protéique à un pH donné :

$$\bar{H}_d^+ = \bar{\nu}_1\ (1 - \alpha_1) + \bar{\nu}_2\ (1 - \alpha_2) + \bar{\nu}_3\ (1 - \alpha_3) \ldots + \bar{\nu}_5\ (1 - \alpha_5) \qquad (10)$$

Notons que le même raisonnement serait valable si nous voulions connaître K_H en supposant connue la valeur de K_{Cu}. On peut voir là une méthode intéressante, dans certains cas, pour déterminer le pK_H des groupes anormaux en particulier.

III.- ETUDE EXPERIMENTALE DE LA FIXATION DE L'ION CUIVRE, PAR DIFFERENTES TECHNIQUES

A.- INTRODUCTION

La fixation d'ions Cu^{++} par la molécule de β-lactoglobuline se traduit expérimentalement par l'apparition de phénomènes très différents suivant la technique choisie. Chacun de ces phénomènes nous apportera des renseignements complémentaires sur la nature des interactions protéine-cuivre. Les principales techniques utilisées sont :

La polarimétrie : pour étudier les changements de structure associés à la fixation du métal sur la protéine.

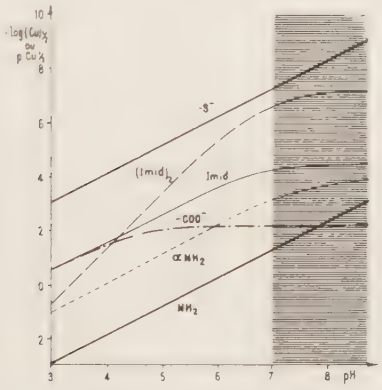


Fig. 33 - Variation de $pCu\frac{1}{2}$ en fonction de pH pour les différents types de groupes de la β-lactoglobuline.

(Imid)$_2$ est un site particulier de la β-lactoglobuline (cf. p. 118). La région hachurée correspond à la zone de pH où se forme $Cu(OH)_2$.

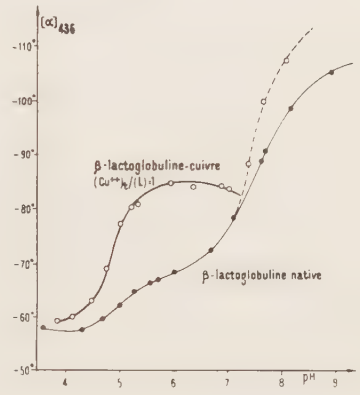


Fig. 34 - Courbe 1 : β-lactoglobuline native.

Courbe 2 : β-lactoglobuline-Cuivre : $(Cu^{++})_t/(L) = 1$.

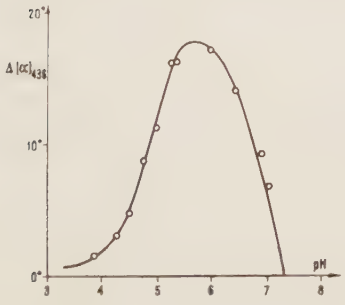


Fig. 35 - Différence entre les courbes 1 et 2 de la figure 34.

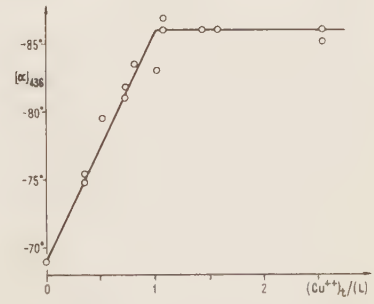


Fig. 36 - Effet de $(Cu^{++})_t$ sur le pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline à pH 6.

L'ultra-centrifugation analytique : pour connaître les variations de structure quaternaire de la protéine.

La spectrophotométrie : pour identifier la nature du complexe protéine-cuivre.

La potentiométrie : pour déterminer la valeur des constantes de dissociation de l'ion cuivre.

Le principe de la méthode est commun à toutes ces techniques : il se ramène à l'étude de la variation d'intensité d'un signal en fonction de la valeur de l'activité des ions hydrogène et de la concentration totale en ions cuivre de la solution protéique.

Nous rapporterons successivement les principaux résultats obtenus par les différentes techniques utilisées.

B.- POLARIMETRIE

1.- RESULTATS

Nous avons observé que les propriétés rotatoires de la β-lactoglobuline sont modifiées instantanément par addition de faibles quantités d'ion cuivre ($CuSO_4$) à une solution de cette protéine de pH voisin de 6.

Les courbes de la figure 34 représentent la variation, en fonction du pH, du pouvoir rotatoire spécifique de la β-lactoglobuline B en solution en absence d'ion Cu^{++} (courbe 1) et en présence d'un ion Cu^{++} par protomère (courbe 2).

La différence de pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{436}$, entre la protéine native et la protéine en présence d'un ion Cu^{++} croît de pH 4 à pH 6 en décrivant une sigmoïde puis décroît ensuite pour s'annuler au voisinage de pH 7,3 (fig. 35).

La variation de $[\alpha]_{436}$, au pH d'effet optimum (pH 6), augmente en fonction du nombre d'ions cuivre ajouté et la valeur de $[\alpha]_{436}$ atteint une limite quand *le nombre d'ions cuivre ajouté est égal au nombre de protomères de β-lactoglobuline* présent dans la solution (fig. 36). Un léger excès d'ion cuivrique ne produit aucun effet. Pour les fortes concentrations de $CuSO_4$ apparait un précipité floconneux d'hydroxyde de cuivre dont la présence ne permet plus les mesures, nous ne savons donc pas si l'effet produit par un ion cuivre sur la β-lactoglobuline peut être inhibé par un grand excès de cet ion.

Au-delà de pH 7,3, la valeur de $\Delta [\alpha]_{436}$, nulle immédiatement après addition de sulfate de cuivre augmente lentement au cours du temps. Nous étudierons la cinétique d'apparition de ce second phénomène dans le chapitre suivant.

La réversibilité du changement de pouvoir rotatoire associée à la fixation de l'ion cuivre par la β-lactoglobuline a été vérifiée en faisant régresser l'activité des ions cuivre libres par addition, à la solution cupro-protéique,,d'un puissant agent chélatant de l'ion cuivre : l'éthylène-diamine-tétra-acétate ou E.D.T.A. de $pK_{Cu} = 18$. Au-dessous de pH 7,3, l'effet produit par l'ion cuivre est supprimé par l'EDTA tandis que l'effet produit par ce métal aux pH supérieurs à 7,3 ne l'est pas.

Un excès d'ion cuivre, saturant l'EDTA, fait réapparaître la variation de pouvoir rotatoire à pH 6 : le phénomène qui nous intéresse ici est donc réversible.

D'autres métaux voisins du cuivre dans la classification périodique des éléments tels que le *cobalt*, le *nickel* et le *zinc* sont sans effet : ils ne provoquent aucun changement de pouvoir rotatoire de la protéine bien que la fixation de ces cations soit effective comme l'indiquent les mesures potentiométriques.

L'ion mercurique, connu pour son affinité particulièrement forte pour les thiols, ne modifie aucunement, à pH 6, le pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline native et n'inhibe pas non plus l'effet de l'ion cuivre sur la protéine à ce même pH.

2.- DISCUSSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

L'étude polarimétrique nous apporte d'utiles renseignements sur les propriétés de la β-lactoglobuline vis-à-vis de l'ion Cu^{++}.

1.- La fixation d'un ion Cu^{++} par la β-lactoglobuline est associée à un changement de propriétés rotatoires qui ne peut s'interpréter que comme un changement de conformation de la protéine.

2.- La variation de $[\alpha]_{436}$ entre pH 4 et pH 6 traduit le fait que le nombre de protomères ayant fixé un ion Cu^{++} augmente avec la valeur du pH, ce qui prouve que dans cette zone de pH les ions Cu^{++} sont en compétition avec les ions H^+ pour l'occupation de ce site et donc en conséquence la constante de dissociation des ions H^+ fixés sur ce site doit être inférieure à 10^{-6}.

3.- Le site de fixation de l'ion cuivre et la transconformation qu'il implique semblent étroitement spécifique de ce métal.

4.- Il n'y a qu'un seul site par protomère ; or les groupes présents à une seule unité dans cette macromolécule sont : le thiol, les extrémités C et N terminales et le carboxyle anormal. Nous avons montré, par action de l'ion mercurique, que le groupe thiol ne peut être impliqué dans ce site de fixation de l'ion Cu^{++}. Il en est de même pour le carboxyle terminal qui ne porte pas de proton à pH 5. Le carboxyle anormal et le NH_3^+ terminal sont des sites peu probables car ils présentent pour l'ion cuivre une affinité inférieure à celle des imidazoles.

Nous sommes donc amenés logiquement à penser que ce site unique ne peut pas être un ligand simple mais un site complexe formé de plusieurs groupes qui auraient la possibilité de se rapprocher les uns des autres au cours des fluctuations de transconformations dont la β-lactoglobuline semble être continuellement le siège ; la chélation d'un ion cuivrique par ces ligands stabiliserait une certaine structure, comme semble l'indiquer le changement de pouvoir rotatoire lié à la fixation de ce métal par la protéine.

C.- ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

Nous avons mesuré la vitesse de sédimentation de la β-lactoglobuline B en présence d'ions cuivre et à différents pH à 20° et à 59 780 tours/minute.

Nous avons obtenu :

pH	S $(Cu^{++})_t/(L) = 1$	S en absence de Cu^{++}
7,33	3,1	
6,08	3	2,8
5	3,7	(2,85)

((Cu^{++}) et (L) sont égales à $4.\ 10^{-4}$ M).

Les valeurs du coefficient de sédimentation, s, du complexe β-lactoglobuline-cuivre sont sensiblement plus élevées que celles obtenues dans les mêmes conditions en absence d'ion cuivre (Georges et al. 1962). L'écart entre ces valeurs est plus grand à pH 5 qu'a pH 6 ; cela est à rapprocher du fait, qu'au voisinage de pH 5 en présence d'ions Cu^{++} apparaissent des constituants de constante de sédimentation plus élevée. Il semble exister en milieu acide une série d'équilibres multiples entre molécules protéiques, l'ion cuivre bivalent fixé à la surface de la molécule sur les groupes COO^- favoriserait les associations moléculaires.

Ce phénomène est très faible à pH 6 car d'autres sites de fixations ayant plus d'affinité que les carboxyles pour l'ion Cu^{++} sont alors disponibles à la surface de la protéine. Ces associations moléculaires sont considérablement réduites à pH 5 en présence de tampon acétate 0,1 M car il y a alors inhibition compétitive par les ions acétate de la fixation de l'ion Cu^{++} sur les ions aspartate et glutamate de la protéine.

Conclusion :

Il semblerait donc que la légère augmentation du coefficient de sédimentation de la β-lactoglobuline à pH 6 après addition d'ion cuivre puisse être attribuée soit au changement de structure tertiaire de la molécule mis en évidence par polarimétrie, soit plutôt à la présence d'une faible quantité de tétramère en équilibre rapide avec la forme dimère. Mais ce dernier phénomène est plus important près du point isoélectrique qu'à pH 6, il est donc sans rapport direct avec la variation de pouvoir rotatoire observée après addition d'ions cuivre, car celle-ci est plus grande à pH 6 qu'à pH 5.

D.- SPECTROPHOTOMETRIE

Les quantités d'ions cuivre ajoutées aux solutions de β-lactoglobuline dans nos expériences sont trop faibles ($C = 10^{-4}$ M), pour que nous puissions étudier la nature du complexe cuprique par spectrophotométrie dans la région visible du spectre, comme cela est fait le plus souvent.

Cependant le complexe β-lactoglobuline-cuivre absorbe fortement dans l'ultraviolet, (fig. 37) ; le spectre d'absorption présente un maximum à 247 mμ. Pour une valeur donnée du pH l'absorption due à ce complexe augmente en fonction de la concentration en ion cuivre, et pour une concentration donnée ($(Cu^{++})t/(L) = 1$ dans la figure 38) cette absorption croît avec le pH pour atteindre une valeur maximale au voisinage de pH 6,5.

Aux valeurs de pH supérieures, la forme du spectre d'absorption se modifie très nettement, mais sans grande variation de la densité optique à 247 mμ, on notera surtout l'hypochromisme au-dessus de 250 mμ et l'apparition d'anomalies dans la courbe d'absorption aux environs de 290 mμ.

Conclusion :

Le spectre de différence entre la β-lactoglobuline native et le complexe β-lactoglobuline-cuivre obtenu pour des valeurs de pH inférieures à 6 est tout à fait comparable aux spectres de différences obtenus par J. Uriel (1960) dans le cas de complexes de l'ion Cu^{++} avec histidine, l'histamine et la sérumalbumine humaine.

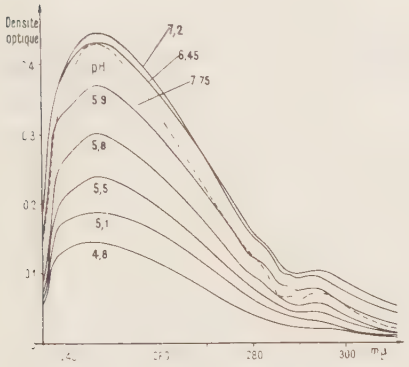


Fig. 37 - Spectre d'absorption du complexe β-lactoglobuline-cuivre à différents pH.

$(c = 1,96$ mg/ml, $(Cu^{++})_t/(L) = 1.)$

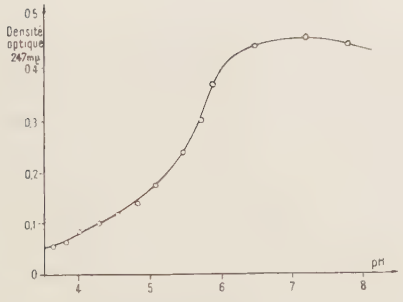


Fig. 38 - Variation d'absorbance du complexe β-lactoglobuline-Cuivre en fonction du pH à 247 mμ.

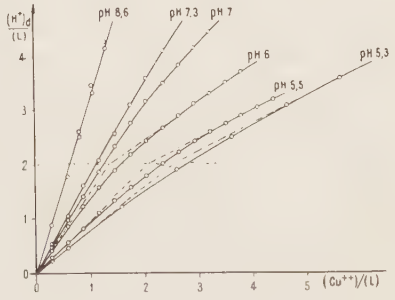


Fig. 39 - Variation du nombre d'ions H^+ déplacés par molécule de β-lactoglobuline en fonction de quantités croissantes d'ions Cu^{++} ajoutées par molécule, à différents pH.

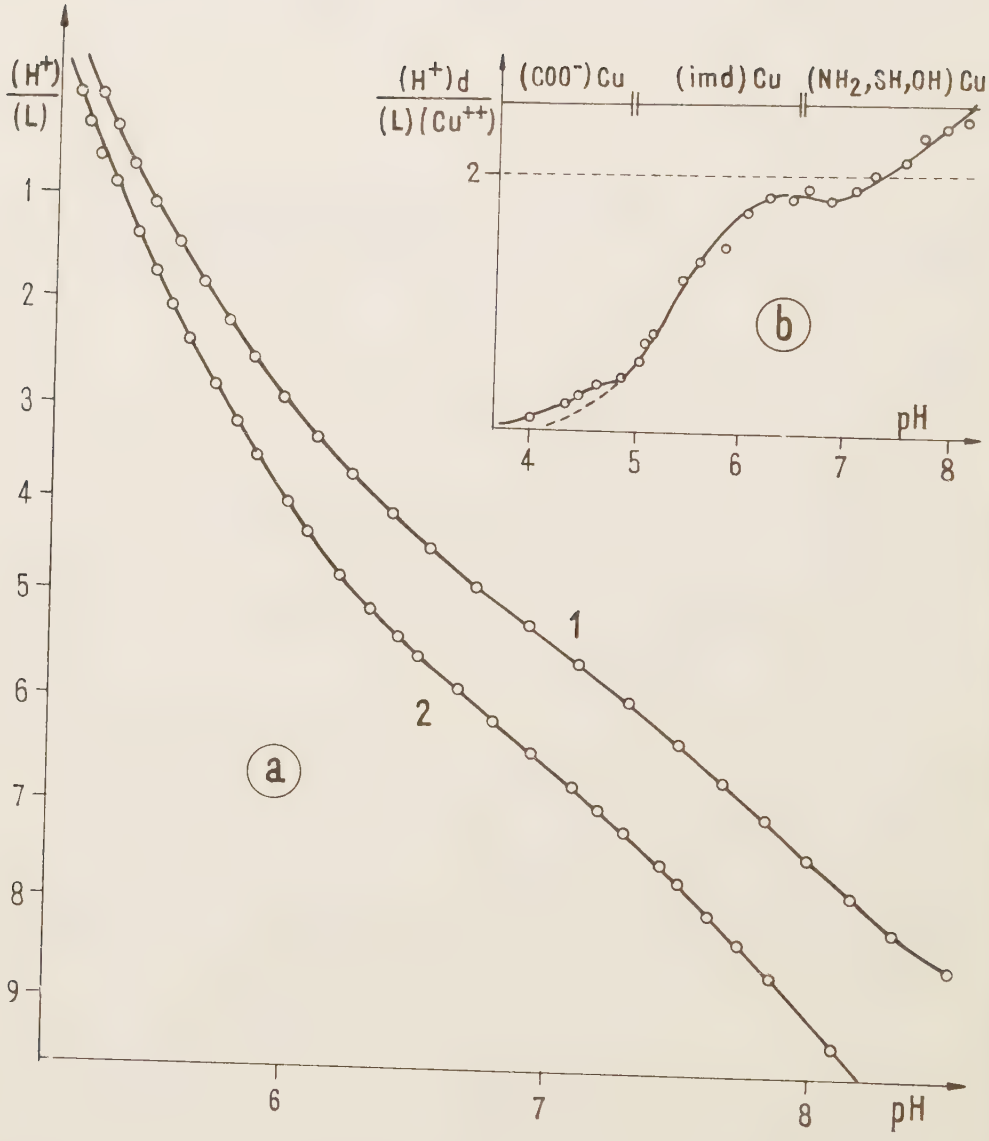


Fig. 40 - a : 1.- Courbe de titrage de la β-lactoglobuline native.
2.- Courbe de titrage de la β-lactoglobuline + 0,8 $(Cu^{++})_t$ par molécule.

b : Nombre de H^+ déplacés par molécule et par ion Cu^{++} en fonction du pH.

Nous pouvons donc dire que en présence d'ions cuivre la β-lactoglobuline présente une différence de spectre caractéristique du complexe cuivre-imidazole. La variation de densité optique en fonction du pH pour une concentration totale donnée en ions Cu^{++} traduit une augmentation de la concentration de complexe Cu-imidazole, celle-ci est très faible à pH 3,7 et maximale à pH 6,5, cet effet est dû à la compétition entre ions Cu^{++} et H^+ pour la fixation sur le site.

Au-delà de pH 6, le changement de forme du spectre d'absorption traduit une modification du complexe β-lactoglobuline-cuivre qui est sans doute due à l'apparition de nouveaux sites de fixation de l'ion Cu^{++} dans la molécule; dans ce nouveau site serait impliqué un groupe SH : en effet, comme nous le verrons plus loin, l'apparition d'anomalies au voisinage de 290 mμ est due à une modification du spectre d'absorption du résidu tryptophane de la protéine qui est associée au démasquage d'un groupe thiol.

Nous remarquerons enfin que la variation de densité optique, en fonction du pH, du complexe β-lactoglobuline-cuivre ($(Cu^{++})_t/(L) = 1$) semble étroitement liée à la variation de pouvoir rotatoire observée dans les mêmes conditions, (fig. 34)

E.- TITRAGE ELECTROMETRIQUE

1.- RESULTATS

L'addition d'ions Cu^{++} à une solution de β-lactoglobuline provoque une nette diminution de la valeur du pH. On peut penser que l'ion cuivre se fixe sur la fraction α de ligand ne portant pas de proton et provoque ainsi, d'après la loi d'action de masse, un déplacement de l'équilibre acide-base par dissociation de la forme acide de ce ligand : $AH^+ \rightleftharpoons A + H^+$. Nous mesurons le nombre d'ions H^+ déplacés en ramenant le pH à sa valeur initiale par addition d'un volume connu de soude titrée; ce nombre comme nous l'avons vu plus haut est proportionnel au nombre moyen d'ions cuivre fixés et à la fraction $(1 - \alpha)$ de ligand portant un proton.

Les courbes de la figure 39 représentent le nombre de protons déplacés par molécule de β-lactoglobuline, à différents pH en fonction de quantités croissantes d'ions cuivre ajoutés par molécule de protéine. Au-dessous de pH 7, ces courbes peuvent se décomposer en deux droites de pentes différentes dont le point de concours correspond à 2 H^+ déplacés par molécule de β-lactoglobuline.

Pour compléter ces résultats, nous avons mesuré le nombre de protons fixés par la β-lactoglobuline en fonction du pH, en absence d'ion cuivre et en présence d'une quantité connue d'ion cuivre, figure 40a. La différence entre ces deux courbes, figure 40b, représente le nombre de protons déplacés par le premier ion cuivre fixé sur la β-lactoglobuline en fonction du pH.

Ces deux expériences montrent que le nombre d'ions H^+, déplacés de la molécule de β-lactoglobuline par un ion cuivre, croît de pH 4 à pH 6; ce qui confirme qu'il y a augmentation en fonction du pH de la proportion de sites occupés par l'ion cuivre.

Le nombre de protons déplacés par un ion Cu^{++} étant voisin de 2, à pH 6, semble prouver que l'ion cuivrique se fixe sur un site formé de deux groupes ionisables. Le fait que les courbes de la figure 39 présentent précisément un changement de pente au niveau de 2 H^+ déplacés semble indiquer que ce site est unique dans la molécule et qu'il est saturé en priorité par les ions cuivre.

Compte-tenu des résultats obtenus par spectrophotométrie et du fait que la molécule de β-lactoglobuline contient seulement 2 groupes imidazole, nous pouvons penser qu'en moyenne, *le premier ion Cu^{++} fixé par la β-lactoglobuline est chélaté par deux imidazoles.* (Au-delà de pH 7 le phénomène est tout autre, nous y reviendrons dans le chapitre suivant).

2 - CONSTANTE DE DISSOCIATION DU COMPLEXE Cu (imid)$_2$

L'évaluation de la constante de dissociation de l'ion cuivre du chélate Cu (imid)$_2$, pose ici le problème que nous avons évoqué page 107 ; nous sommes en présence d'un cas où précisément nous connaissons le nombre et la nature des différents groupes fixant l'ion Cu^+, ainsi que la valeur des constantes d'ionisation et des constantes de dissociation de l'ion Cu^{++}, relatives à chacun des simples ligands ; il reste à déterminer la constante de dissociation du chélate Cu (imid)$_2$, ce site propre à la β-lactoglobuline doit son existence et ses caractéristiques à une particularité structurale de cette protéine.

Nous avons évalué la constante de dissociation du chélate en utilisant les relations suivantes :

$$\text{imid } H^+ \rightleftharpoons \text{imid} + H^+ \qquad K_H = \frac{(\text{imid})\,(H^+)}{(\text{imid } H^+)} = 10^{-6,9}$$

$$(\text{imid})_2Cu \rightleftharpoons 2\ \text{imid.} + Cu^{++} \qquad K_{Cu} = \frac{(\text{imid})^2\,(Cu^{++})}{((\text{imid})_2\ Cu)}$$

La concentration en cuivre libre (Cu^{++}) est tirée de la relation (9)

$$(Cu^{++}) = (Cu^{++})_t - (P)\,(\bar{\nu}_1 + \nu_2 + \nu_3 + \nu_4 + \nu_5) \qquad (11)$$

où $\bar{\nu}_1$, $\bar{\nu}_2$, $\bar{\nu}_3$, $\bar{\nu}_4$ et $\bar{\nu}_5$ représentent le nombre moyen d'ions cuivre fixés respectivement par le groupe SH, le site formé par les 2 imidazoles, les groupes carboxyliques, le groupe αNH_2 et par les groupes ϵNH_2. Or, nous avons vu qu'au-dessous de pH 6 le groupe SH de la protéine est masqué et ne fixe pas l'ion Cu^{++} donc $\bar{\nu}_1 = 0$. D'autre part, comme le montre le diagramme (fig. 33) l'affinité des groupes ϵNH_2 pour l'ion cuivre est très faible en milieu acide et ν_5 est négligeable devant ν_2. Nous avons donc en fait :

$$(Cu^{++}) = (Cu^{++})_t - (P)\,(\bar{\nu}_2 + \bar{\nu}_3 + \bar{\nu}_4) \qquad (12)$$

$\bar{\nu}_2$, $\bar{\nu}_3$ et $\bar{\nu}_4$ peuvent être exprimés en fonction de (Cu^{++}) d'après les relations suivantes :

$$\bar{\nu}_2/(1 - \bar{\nu}_2) = K_2^{-1} \cdot \alpha_2^2 \cdot (Cu^{++}) \qquad (13_a)$$

$$\bar{\nu}_3/(25 - \bar{\nu}_3) = 10^{2,16} \cdot \alpha_3 \cdot (Cu^{++}) \qquad (13_b)$$

$$\nu_4/(1 - \bar{\nu}_4) = 10^{4,15} \cdot \alpha_4 \cdot (Cu^{++}) \qquad (13_c)$$

La valeur de α en fonction du pH, pour les différentes classes de site de la protéine, nous est donnée par la relation (4).

Enfin nous pouvons écrire que le nombre moyen d'ions H^+ déplacés par molécule de lactoglobuline du fait de la fixation des ions Cu^{++} est égal à : $\bar{H}_d^+$

$$\bar{H}_d^+ = \bar{\nu}_2\, 2(1 - \alpha_2) + \bar{\nu}_3\,(1 - \alpha_3) + \bar{\nu}_4\,(1 - \alpha_4) \qquad (14)$$

le coefficient 2 dans le premier terme de droite vient de ce que le site considéré est formé de 2 ligands.

A partir des 5 relations précédentes nous avons calculé la valeur de la concentration en cuivre libre en faisant deux approximations successives : nous partons d'une valeur de (Cu^{++}), déjà très proche de la valeur réelle, obtenue en considérant, en première approximation, que la fraction de carboxyles dissociés est peu différente de 1 et donc que la fixation de Cu^{++} par les groupes COO^- ne déplace qu'un nombre négligeable de protons, ce qui peut être considéré comme exact au voisinage de pH 6.

La valeur de (Cu^{++}) à un pH donné nous permet de connaître $\bar{\nu}_3$ et $\bar{\nu}_4$ et par différence d'obtenir la valeur de ν_2 de l'équ. (12). Connaissant la valeur de (Cu^{++}) et de ν_2 il est alors possible de tirer de l'équation (13a) la valeur de la constante de dissociation de l'ion cuivre du chélate Cu $(imid)_2$.

Les valeurs obtenues à différents pH sont les suivantes :

pH	6	5,5	5,3	5,13
pK_{Cu}	6,6	6,8	6,95	7,1

IV.- DISCUSSION GENERALE

Les différentes techniques utilisées dans l'étude de la fixation de l'ion Cu^{++} par la β-lactoglobuline B ont permis de mettre en évidence plusieurs aspects du même phénomène et ainsi d'arriver aux conclusions suivantes :

La β-lactoglobuline possède un site particulier de fixation de l'ion cuivrique dans lequel sont impliqués deux groupes imidazoles appartenant aux deux résidus histidine de la protéine. *La fixation de l'ion Cu^{++} par ce site est associée à un changement réversible de la structure de la molécule protéique.*

Or la β-lactoglobuline B, comme la β-lactoglobuline A, ne possède que 2 groupes imidazoles par protomère et nous savons qu'un de ces groupes se trouve à l'extrémité de la chaîne polypeptidique, après l'isoleucine C terminale. Il serait fort intéressant de connaître la position du second imidazole dont nous savons seulement qu'il ne se trouve pas dans les dix derniers résidus de l'extrémité C terminale (51). Néanmoins ces données nous permettent de proposer un modèle et un mécanisme de réaction probable qui rendent compte du changement de structure associé à la formation du chélate :

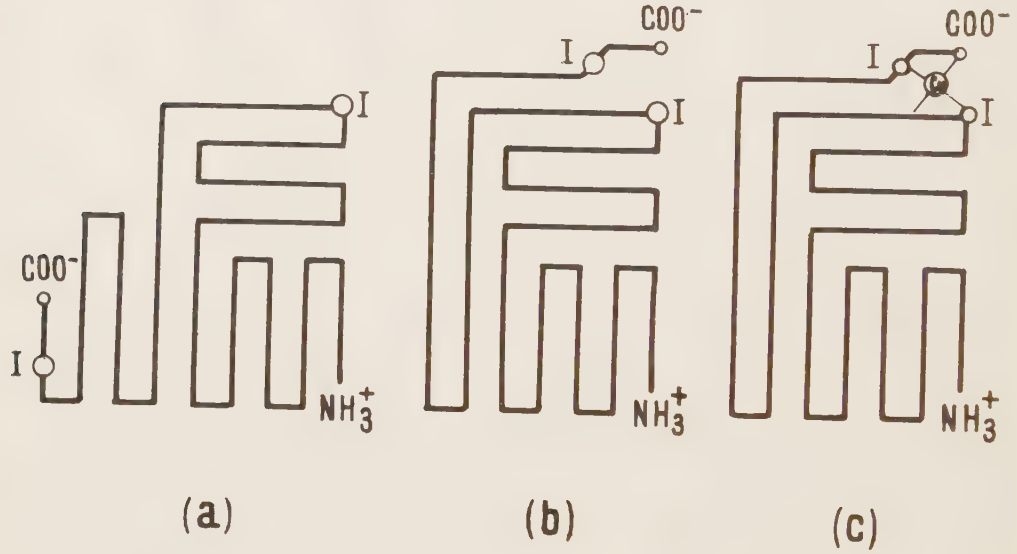


Fig. 41 a.

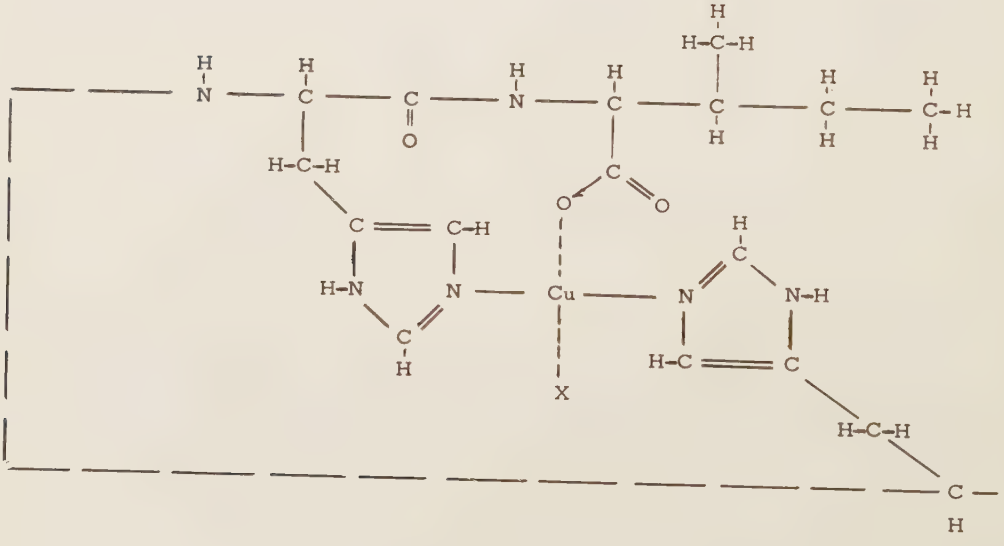


Fig. 41 b - (X est soit un atome d'oxygène, soit un atome d'azote).

Les faits observés nous laissent supposer que l'extrémité C terminale possède quelques degrés de liberté qui donnent une certaine probabilité d'existence à une conformation moléculaire où les deux imidazoles seraient proches l'un de l'autre ; la chélation de l'ion Cu^{++} par ces deux imidazoles rendrait cette conformation très probable.

Ce qui revient à dire qu'une partie de l'enthalpie libre de fixation du cuivre est utilisée pour stabiliser une conformation particulière de la molécule et explique ainsi la valeur anormalement basse trouvée pour pK_{Cu}. En effet, nous avons obtenu une valeur moyenne de pK_{Cu} voisine de 7 pour le complexe $Cu(imid)_2$ de la β-lactoglobuline, soit $\Delta G = 9\,500$ cal/mole, alors que le chélate cuivre-histidylhistidine a une valeur de pK_{Cu} voisine de 12, soit $\Delta G = 16\,000$ cal/mole. (Doran *et al* (1964)).

Cette différence se comprend aisément ; en effet la constante de dissociation que nous mesurons est une constante de dissociation apparente qui traduit un phénomène global. Ce phénomène comprend le changement de conformation de la protéine qui aboutit à la formation d'un site particulier et ensuite, la chélation de l'ion cuivre par le site ainsi formé. Il y a donc deux équilibres consécutifs, nous les représenterons de la façon suivante :

$$L \rightleftharpoons L' \qquad K' = (L')/(L)$$

$$L' + Cu^{++} \rightleftharpoons L'Cu \qquad K'_{Cu} = (L')(Cu^{++})/(L'Cu)$$

l'équilibre global est représenté par :

$$L + Cu^{++} \rightleftharpoons L'Cu \qquad K_{Cu} = (L)\,(Cu^{++})/(L'Cu)$$

$$K_{Cu} = K'_{Cu}/K'$$

Si, nous référant au complexe Cu-histidylhistidine nous admettons que $pK'_{Cu} = 12$, sachant que $pK_{Cu} \simeq 7$, nous obtenons pour l'équilibre de transconformation : $K' = 10^{-5}$. Cette valeur de K'ne doit être considérée que comme un ordre de grandeur en raison de l'incertitude sur la valeur de pK'_{Cu}, néanmoins cette valeur indique que la transconformation de L en L' est extrêmement peu probable en l'absence d'ion cuivre.

Ce changement de structure induit par l'ion cuivre est une preuve de plus en faveur du rôle important que peut jouer un tel ligand dans la détermination d'une structure particulière de la protéine. Il y a sans doute là un rapprochement à faire avec les *métallo-enzymes* où le métal ne joue pas directement un rôle catalytique mais est cependant indispensable à l'activité de l'enzyme.

CHAPITRE VI

ETUDE CINETIQUE DE L'ACTION DES IONS CUIVRIQUES SUR LA β-LACTOGLOBULINE AU-DESSUS DE pH 7 : ROLE DU GROUPE THIOL

I.- INTRODUCTION

Au cours de l'étude précédente où nous avons montré, qu'entre pH 4 et pH 6,5, la β-lactoglobuline en présence d'ion Cu^{++} subissait un changement de structure réversible associé à la formation d'un chélate $Cu(imid)_2$, nous avons également vu par les différentes techniques utilisées qu'au-dessus de pH 6,5 un nouveau phénomène se manifestait. C'est cet effet de la fixation de l'ion Cu^{++} sur la β-lactoglobuline, à des pH supérieurs à 6,5 que nous allons étudier maintenant.

Ce phénomène s'est montré d'emblée très complexe et propre à exciter la curiosité. Nous avons observé tout d'abord que la β-lactoglobuline en solution aqueuse en présence d'ion cuivre et pour des valeurs de pH supérieures à pH 7 présente une bande d'absorption très particulière à 375 mμ (fig. 42). Cette bande d'absorption semble tout à fait comparable à celle découverte en 1952 par Klotz *et al* dans leur étude sur les complexes cuivre-sérumalbumine. Ces auteurs ont interprété l'existence de cette bande d'absorption comme étant due à une interaction d'un type particulier et inconnu de l'ion cuivre avec le groupe SH de la sérumalbumine bovine. Cette mystérieuse bande d'absorption n'a été retrouvée, par Klotz et ses collaborateurs, avec aucun autre complexe de l'ion cuivre : de nombreuses substances organiques contenant l'atome de soufre ont été essayées ainsi que des protéines possédant des groupes thiol, telles que : l'ovalbumine, la sérumalbumine humaine, *la β-lactoglobuline,* la pepsine, le fibrinogène... etc, mais toujours sans succès (58).

Klotz *et al* ont été amenés, de ce fait, à conclure qu'une structure très particulière de la sérumalbumine bovine, dans laquelle la présence d'un groupe thiol serait à proximité d'un pont disulfure, devait être responsable de cette absorption. Ces auteurs ont également montré que cette absorption diminuait lentement au cours du temps (plusieurs jours à pH 6) et que l'oxygène moléculaire n'était pas nécessaire à la réaction (58).

Sur la base de ce travail nous avons entrepris l'étude de ce phénomène sur la β-lactoglobuline bovine.

II.- TECHNIQUE

La principale technique employée pour cette étude est naturellement la spectrophotométrie mais toujours associée à d'autres techniques telles que la spectropolarimétrie, la potentiométrie et l'ultracentrifugation analytique.

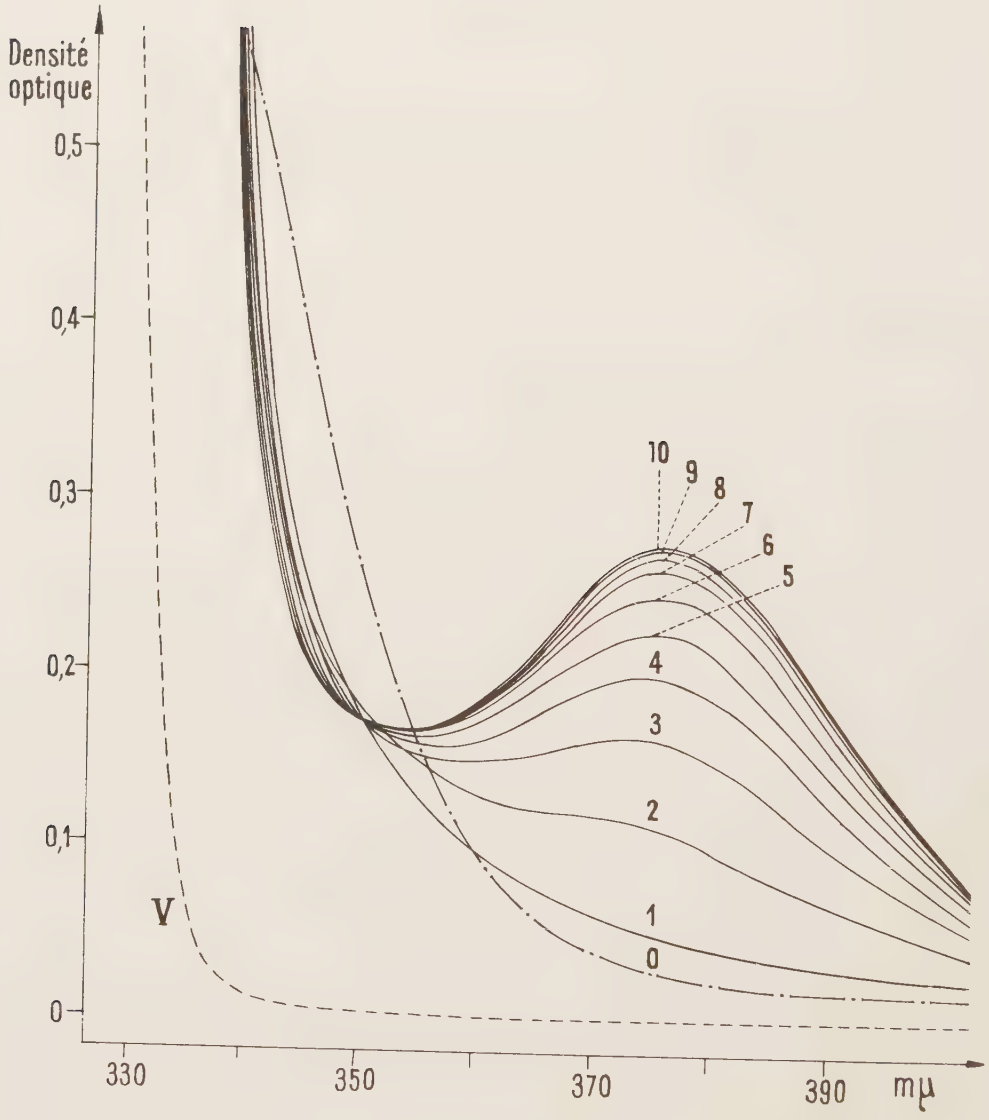


Fig. 42 - 1 à 10 : Spectres d'absorption, du complexe β-lactoglobuline-Cuivre à pH 8,6, enregistrés à 16 secondes d'intervalles (voir texte).

v : Spectre d'absorption du tampon véronal.

0 : Spectre d'absorption de la solution véronal-cuivre.

Le matériel employé ici est la β-lactoglobuline A, car en présence de Cu^{++} elle présente un maximum d'absorption à 375 mμ plus important que celui de la β-lactoglobuline B. Les solutions protéiques sont généralement tamponnées par le véronal (Diéthylmalonylurée) de force ionique μ 0,1 qui ne possède qu'une affinité très faible pour l'ion Cu^{++} ; des expériences témoins faites en absence de tampon nous ont montré que le véronal n'intervenait pas dans les phénomènes observés. Les concentrations de β-lactoglobuline utilisées sont de l'ordre de 1 à 5 mg par ml. Pour les longueurs d'onde supérieures à 310 mμ, l'absorption observée est entièrement due au complexe cuivre-lactoglobuline.

Quelle que soit la technique employée le processus expérimental est toujours le même : nous introduisons dans la cuve de mesure à l'aide d'une pipette à striction jaugeant 2,360 ml, la solution tampon puis toujours à l'aide d'une pipette à struction nous ajoutons une petite quantité, de 0,050 à 0,400 ml, d'une solution mère de β-lactoglobuline dans NaCl 0,1 M, et enfin, nous déclenchons la réaction en injectant à la micropipette une quantité donnée d'une solution de sulfate de cuivre 10^{-2} M. Dans quelques expériences cependant (fig. 42) la protéine est ajoutée en dernier lieu à la solution de véronal et de sulfate de cuivre.

III.- RESULTATS ET DISCUSSION

A.- INTRODUCTION

Après avoir constaté l'existence à 375 mμ de cette bande d'absorption particulière du complexe β-lactoglobuline-cuivre, nous avons observé que l'apparition de cette bande d'absorption n'était pas instantanée, quoique très rapide, et qu'elle était suivie ensuite d'une disparition lente.

La figure 42 représente une série de spectres montrant l'apparition, au cours du temps, de la bande d'absorption à 375 mμ du complexe lactoglobuline-cuivre. Un spectre est enregistré en 8 secondes, toutes les 16 secondes. Les conditions expérimentales sont les suivantes : β-lactoglobuline A conc. 0,95 10^{-4} M (M = 18 000) SO_4 Cu 2,1 10^{-4} M, tampon véronal μ 0,1, pH 8,6 et température 22°C. Dans cette expérience la β-lactoglobuline est injectée au dernier moment dans la cuve de mesure. Le spectre n° 0 dû au complexe véronal-cuivre disparait instantanément après l'addition de β-lactoglobuline.

La figure 43 montre la variation, au cours du temps de la densité optique à 375 mμ, du complexe β-lactoglobuline-cuivre : l'expérience a été faite à 22°C, à pH 8,6, β-lactoglobuline 3,1 10^{-4} M et SO_4 Cu 8 10^{-4} M.

Ces deux figures nous montrent l'aspect général du phénomène que nous allons étudier maintenant de façon systématique.

B.- ETUDE CINETIQUE DE L'EFFET DE Cu^{++} SUR LA β-LACTOGLOBULINE

L'allure particulière de la courbe de variation de la densité optique à 375 mμ après addition d'ion cuivre à une solution de β-lactoglobuline semble traduire *l'apparition et la disparition d'un complexe transitoire métastable,* tel que l'on devrait l'observer théoriquement dans le cas de deux réactions consécutives du type :

$$A \longrightarrow B \longrightarrow C$$

où seul le complexe intermédiaire B présenterait la propriété d'absorber les radiations de longueur d'onde voisine de 375 mμ.

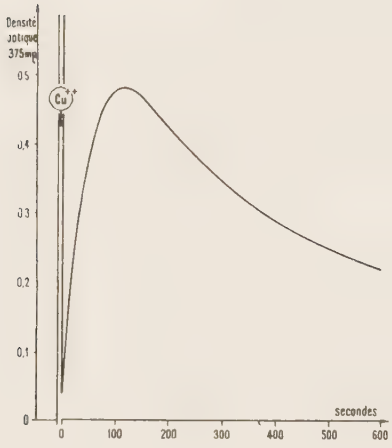


Fig. 43 - Cinétique d'apparition et de disparition de la bande d'absorption à 375 mμ du complexe β-lactoglobuline-Cuivre en présence d'un ion cuivre, (voir texte).

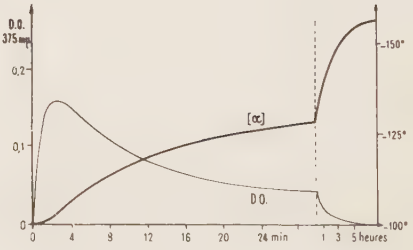


Fig. 44 - Variation au cours du temps de la densité optique et du pouvoir rotatoire du complexe lactoglobuline-Cuivre.

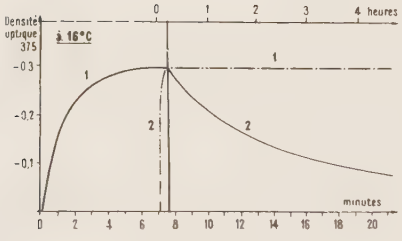


Fig. 45 - Cinétiques distinctes et à deux échelles différentes de l'apparition et de la disparition de la bande d'absorption à 375 mμ du complexe intermédiaire β-lactoglobuline-Cuivre.

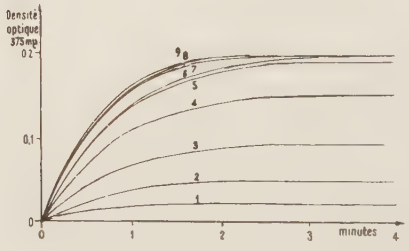


Fig. 46 - Cinétiques de formation du complexe β-lactoglobuline-Cuivre pour différentes quantités d'ion Cuivre ajoutées.

Nous avons confirmé la validité de ce schéma général de réaction en effectuant l'expérience suivante :

Nous avons suivi la cinétique du complexe β-lactoglobuline-cuivre par deux techniques différentes, spectrophotométrie et spectropolarimétrie, dans des conditions expérimentales identiques (β-lactoglobuline 5,6 mg/ml, soit 3,1 10^{-4} M, SO_4 Cu 3,5 10^{-4} M, tampon véronal μ 0,1 pH 8,33 et à 22°C). La variation de densité optique est suivie à 375 mμ et la variation de pouvoir rotatoire est observée à 436 mμ

Les résultats obtenus sont représentés par la figure 44. Nous remarquerons tout d'abord que les cinétiques obtenues par les deux techniques sont très différentes l'une de l'autre. L'apparition du complexe intermédiaire absorbant à 375 mμ ne s'accompagne d'aucune variation du pouvoir rotatoire de la protéine, par contre la disparition de la bande d'absorption semble étroitement liée à l'importante variation de pouvoir rotatoire qui apparait après un temps de latence nettement marqué. Ce temps de latence correspond à la formation du complexe intermédiaire; ce qui prouve que la première réaction est nécessaire à l'évolution de la seconde et par conséquent que ces deux réactions intéressent, directement ou indirectement, le même centre réactionnel dans la molécule protéique. Il s'agit donc bien de réactions consécutive

Cependant le mécanisme de réaction n'est pas encore précisé; ces réactions consécutives peuvent être de quatre types, soit :

Uni-unimoléculaire $A \longrightarrow B \longrightarrow C$

Uni-bimoléculaire a) $A \longrightarrow B$

$2\,B \longrightarrow C$

ou b) $A \longrightarrow B$

$B + D \longrightarrow C$

Bi-unimoléculaire $2\,A \longrightarrow B \longrightarrow C$

Bi-bimoléculaire $2\,A \longrightarrow B$

$2\,B \longrightarrow C$

L'intégration des équations relatives à ces cinétiques de réactions a été faite par J-Y Chien (1948).

1.- ORDRE DE REACTIONS

Pour connaître de façon simple et sans conteste l'ordre des deux réactions consécutives du système β-lactoglobuline + cuivre nous avons recherché les conditions expérimentales qui permettraient de séparer dans le temps les deux réactions consécutives. Nous avons observé, qu'en diminuant la concentration du mélange réactionnel ou en abaissant la température de la solution, la vitesse de la deuxième réaction était fortement ralentie par rapport à la vitesse de la première réaction.

La cinétique de réaction représentée par la figure 45 a été obtenue à la température de 16°C, à pH 8,6 β-lactoglobuline 10^{-4} M et SO_4 Cu 1,8 10^{-4} M : dans ces conditions la vitesse de décroissance du pic à 375 mμ est négligeable par rapport à la vitesse d'apparition de ce pic, et l'on obtient ainsi à la fin de la première réaction plus de 99 % des molécules à l'état de complexe intermédiaire. La décroissance lente de la bande d'absorption en fonction du temps représente alors uniquement la cinétique de disparition du complexe transitoire non perturbée par l'apparition de ce produit.

Les résultats obtenus à partir de l'analyse des courbes de la figure 45 sont les suivants :

- la courbe 1 est exponentielle,

$$y = e^{k_1 t}, \text{ où } y = DO/DO_{max},$$

la réaction 1 est donc du premier ordre ; sa constante de vitesse

$$k_1 = 5{,}2\ 10^{-3} s^{-1} \text{ à } 16°C$$

- la courbe 2 est une branche d'hyperbole,

$$y = 1/(k_2 t + 1), \text{ où } y = (DO_{max} - DO)/DO_{max},$$

la réaction 2 est donc du deuxième ordre ; sa constante de vitesse

$$k_2 = 1{,}65\ l \cdot mole^{-1} \cdot s^{-1} \text{ à } 16°C$$

Le schéma de réaction est donc du type uni-bimoléculaire.

2.- EFFET DE LA CONCENTRATION EN ION Cu^{++}

Pour mieux comprendre le mécanisme de ces deux réactions consécutives nous avons étudié la cinétique d'apparition et de disparition du complexe intermédiaire en fonction de la concentration totale en ions Cu^{++} de la solution, la concentration en β-lactoglobuline étant constante et égale, dans l'expérience représentée par la figure 46, à $0{,}93\ 10^{-4}$ M, (pH 8,6 et t 20°C).

Pour les faibles concentrations en ions cuivre la vitesse de la première réaction est proportionnelle à la quantité totale d'ions Cu^{++} ajoutée, puis, comme le montrent les figures 46 et 47, pour les concentrations plus fortes en ions Cu^{++}, $(Cu^{++})_t/(L) \geqslant 2$, on atteint une vitesse limite ; la densité optique obtenue en fin de réaction devient alors indépendante de la concentration en ions Cu^{++}.

La vitesse d'apparition du complexe intermédiaire en dépend donc pas directement de la concentration en ion cuivre, mais de la concentration d'un complexe initial, β-lactoglobuline-cuivre, qui se formerait rapidement et ne possèderait pas de bande d'absorption à 375 mμ. Nous sommes ainsi amenés à proposer pour la première partie de la réaction le schéma suivant :

$$L + n\ Cu^{++} \underset{K}{\rightleftharpoons} (LCu_n)_A \xrightarrow[k_1]{} (LCu_n)_B$$

où n est égal ou inférieur à 2.

Ce schéma de réaction montre que la vitesse d'apparition du complexe chromophore B est proportionnelle à la concentration du complexe A :

$$\frac{d(LCu_n)_B}{dt} = k_1 (LCu_n)_A$$

la concentration du complexe A est fonction de la concentration protéique et de la concentration en ions Cu^{++} de la solution.

$$\frac{(LCu_n)_A}{(L)\ Cu^{++})^n} = K$$

en présence d'un excès d'ions Cu^{++} l'équilibre ci-dessus est déplacé vers la formation du complexe A et la réaction $A \rightarrow B$ atteint alors sa vitesse limite.

L'équilibre de fixation de l'ion cuivre est une réaction très rapide, la fig. 42 nous montre en effet que le spectre du complexe véronal-cuivre disparaît instantanément après addition de la β-lactoglobuline ; ce qui signifie que les ions Cu^{++} sont presque tous fixés par la protéine au temps ϵ de la réaction $A \rightarrow B$.

Nous venons de voir que la réaction n° 1 atteint sa vitesse maximale pour une valeur du rapport $(Cu^{++})_t/(L)$ voisine de 2 ; pour une telle valeur, la vitesse de la seconde réaction est encore très lente et elle n'atteindra à son tour une vitesse limite que pour des valeurs de $(Cu^{++})_t/(L)$ supérieures à 5. Il apparaît donc qu'un excès d'ions cuivre favorise la disparition du complexe $(L\ Cu_n)_B$ suivant un processus du 2ème ordre qui pourrait être une dimérisation :

$$2\ (LCu_n)_B \xrightarrow[k_2]{+\ Cu^{++}} (Cu_nL - LCu_n)_C$$

Cette hypothèse trouve une justification dans le fait que la valeur de la constante de vitesse de sédimentation de la β-lactoglobuline avant et après l'action des ions cuivre à pH 8,6 à 20°C et pour une concentration protéique de 4 mg/ml passe de 2,1 à 2,5 unités svedberg.

3.- EFFET DU pH

Nous avons étudié les modifications spectroscopiques du complexe β-lactoglobuline-cuivre en fonction de l'activité des ions H^+ de la solution cupro-protéique à 22°C en présence de véronal. Dans toutes ces expériences les concentrations avaient les valeurs suivantes :

β-lactoglobuline A $0{,}95 \cdot 10^{-4}$M et $CuSO_4$ $2{,}1 \cdot 10^{-4}$M

Nous avons d'une part étudié les changements de spectre d'absorption du complexe β-lactoglobuline-cuivre en fonction du temps, en enregistrant un spectre toutes les 16 secondes et ceci à différents pH et d'autre part, de façon continue, nous avons enregistré les variations de densité optique à 375 mμ en fonction du temps pour différentes valeurs de pH.

Les résultats obtenus montrent (fig. 48) que le maximum d'absorption du complexe β-lactoglobuline-cuivre se situe à 375 mμ pour des valeurs de pH inférieures à 9, ce maximum se déplace ensuite, pour des valeurs de pH plus élevées, vers les plus courtes longueurs d'onde. La position du maximum d'absorption reste la même au cours des deux réactions consécutives.

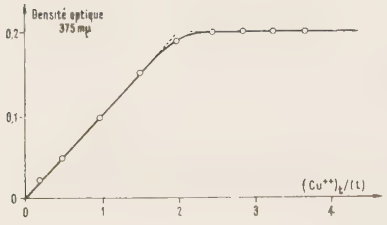


Fig. 47 - D.O.375 maximale du complexe β-lactoglobuline-Cuivre en fonction de la quantité d'ion Cu^{++} ajoutée par molécule de protéine.

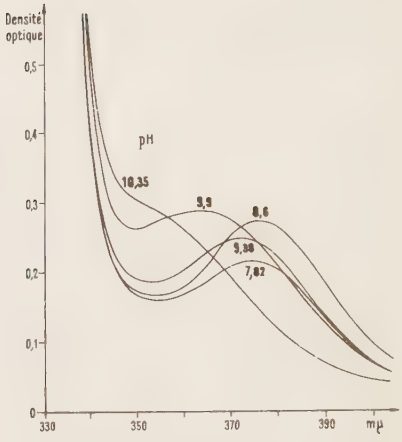


Fig. 48 - Spectre d'absorption du complexe β-lactoglobuline-Cuivre à différents pH. (β-lactoglobuline 0,95 10^{-4}M, $CuSO_4$ 2,1 10^{-4}M).

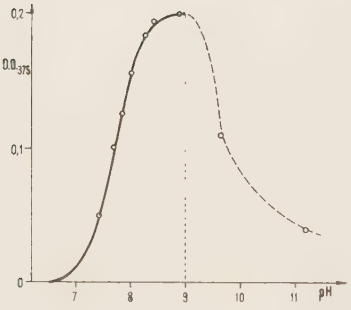


Fig. 49 - Variation de $D.O_{375}$ max. en fonction du pH.

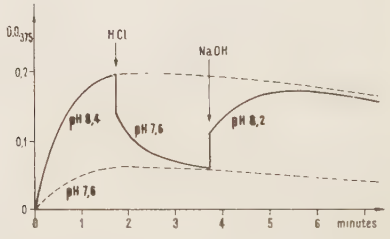


Fig. 50 - Effet d'une variation brusque de pH sur la cinétique de formation du complexe intermédiaire β-lactoglobulaire-Cuivre.

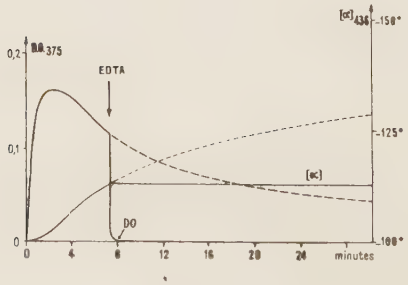


Fig. 51.

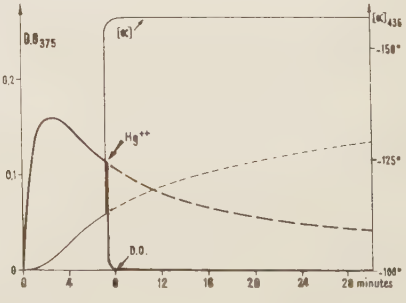


Fig. 52.

La vitesse d'apparition de la bande d'absorption à 375 mμ ne dépend que très peu de la valeur du pH de la solution cupro-protéique comme l'indique les résultats obtenus à 22°C :

pH	Temps de demi-réaction τ(seconde)	Constante de vitesse $k_1\ s^{-1} \times 10^3$
7,43	41,4 s.	16
7,72	41,4	16
7,84	38	18
8,07	34,4	20
8,28	32	22
8,43	27,5	25
8,90	25,2	27
9,66	39	18

La valeur de la constante de vitesse k_1 a été calculée à partir du temps de demi-réaction :

$$\tau = \frac{2{,}3 \log 2}{k_1} \quad \text{soit } k_1 = \frac{0{,}69}{\tau}$$

La vitesse de décroissance de la bande d'absorption à 375 mμ est de même très peu influencée par les variations de pH.

Si la vitesse des réactions dépend assez peu de la valeur du pH par contre la densité optique maximale du complexe β-lactoglobuline-Cu en dépend fortement. La bande d'absorption n'apparaît pas au-dessous de pH 7 et elle atteint sa valeur maximale au voisinage de pH 9.

Les points expérimentaux, représentant la valeur maximale de la densité optique atteinte à 375 mμ, sont portés en fonction du pH, figure 49. Ces points expérimentaux se placent sur une courbe sigmoïde dont l'équation est de la forme :

$$Y = \frac{1}{1 + \frac{(H^+)^2}{(K)^2}}$$

où $pK = -\log K = 7{,}75$.

Il semble donc que la densité optique du complexe β-lactoglobuline-cuivre dépende de l'équilibre d'ionisation de deux groupes titrables dont le pK apparent est de 7,75.

La densité optique de la solution à 375 mμ serait proportionnelle au nombre de molécules à l'état de complexe chromophore. Le rapport du nombre de molécules absorbant à 375 mμ au nombre de molécules total est égal, pour les valeurs de pH inférieures à 9, à :

$$Y = \frac{D_{375}}{D_{375\,max.}}$$

D_{375} représentant la densité optique mesurée à un pH donné et D_{375} max. la valeur de la densité optique à pH 9, (Cu^{++} non limitant).

Sachant que D_{375} max. est égal à 0,3 pour une concentration en β-lactoglobuline de 10^{-4} M, nous obtenons pour la valeur du coefficient d'extinction moléculaire du complexe β-lactoglobuline-cuivre :

$$\epsilon_{375} = 3000$$

Dans la région violette du spectre visible, les coefficients d'extinction moléculaire des complexes du cuivre excèdent rarement 100 (58).

4.- REVERSIBILITE DE L'EFFET DU pH

Réaction n° 1

Le fait que la densité optique, à 375 mμ, du complexe β-lactoglobuline-cuivre soit une fonction apparemment simple du pH que l'on peut écrire :

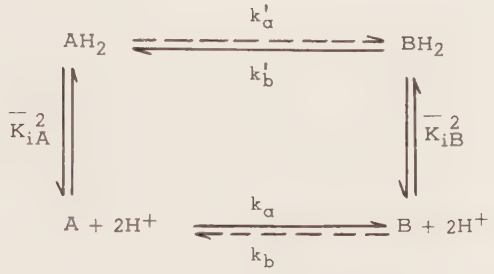
$$D_{375} = \frac{D_{375\ max.}}{1 + (H^+ / 10^{-7,75})^2}$$

indique que la présence de la bande d'absorption à 375 mμ dépend de l'équilibre d'ionisation de deux groupes titrables de pK apparent 7,75. On doit donc s'attendre à ce qu'une variation du pH entraîne une variation réversible de la valeur de la densité optique.

Nous avons dans des expériences réalisées dans les mêmes conditions que les précédentes, fait varier le pH de la solution cupro-protéique par addition de HCl N/10 ou de NaOH N/10 au cours de la phase stationnaire de la réaction. En abaissant en 5 secondes la valeur du pH de 8,4 à 7,6, on observe comme le montre la figure 50 une diminution instantanée de l'absorption à 375 mμ suivie d'une diminution lente et exponentielle de cette absorption. Le passage de pH 7,6 à pH 8,2 se fait suivant un processus symétrique; augmentation instantanée suivie d'une augmentation lente et exponentielle de la densité optique.

Les variations de pH à la fin de la réaction 1, mettent en évidence l'existence d'un équilibre dynamique complexe comprenant au moins un équilibre rapide et un équilibre lent. La valeur du pH règle le niveau des différents équilibres mais ne modifie pas de façon notable la constante apparente de la vitesse de la réaction.

En conséquence l'apparition du complexe chromophore $(LCu)_B$ et sa concentration à l'équilibre semble pouvoir être représentées par un mécanisme type :



(1)

où B représente seul le complexe absorbant à 375 mμ.

La variation rapide d'absorption que l'on observe en faisant varier le pH d'une solution contenant le complexe B s'explique d'après ce schéma par un déplacement de l'équilibre d'ionisation :

$$BH_2 \rightleftharpoons B + 2\,H^+ \qquad \bar{K}_{iB}^2 = \frac{(B)\,(H^+)^2}{(BH_2)} \qquad (2)$$

et la variation lente d'absorption par un déplacement des équilibres de transconformation :

$$A \underset{k_b}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} B \qquad \text{et} \qquad AH_2 \underset{k'_b}{\overset{k'_a}{\rightleftharpoons}} BH_2 \qquad (3)$$

La vitesse d'apparition de B (le complexe chromophore) peut être exprimée par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{d(B)}{dt} = \left[k_a \frac{K_{iA}^2}{(H)^2} + k'_a \right] AH_2 - \left[k_b \frac{K_{iB}^2}{(H)^2} + k'_b \right] BH_2 \qquad (4)$$

A l'état stationnaire cette expression devient :

$$\frac{d(B)}{dt} = \left[\frac{K_{iA}^2}{K_{iB}^2} \frac{k_a k'_b}{k'_a} - k_b \right] (B) = 0 \qquad (5)$$

(B) étant différent de zéro on tire de cette expression :

$$\frac{\bar{K}_{iA}^2}{\bar{K}_{iB}^2} = \frac{k'_a \cdot k_b}{k'_b \cdot k_a} \qquad (6)$$

or d'après le sens de l'évolution des réactions (3), nous voyons que :

$k_a > k_b$ et $k'_b > k'_a$, on en déduit donc : $\overline{K}_{iB} > \overline{K}_{iA}$

ou : $p\overline{K}_{iB} < p\overline{K}_{iA}$ (7)

On peut se demander, à partir des résultats obtenus, quelle est la signification de la constante d'ionisation que nous avons déterminée plus haut en étudiant la variation relative de densité optique à 375 mμ en fonction de (H^+). Rappelons que nous avions $DO_{375}/DO_{375max.} = Y$.

et : $$Y = \frac{1}{1 + \frac{(H^+)^2}{\overline{K}^2}} \quad \text{avec } \overline{K}^2 = (10^{-7,75})^2 \qquad (8)$$

D'après le schéma d'équilibre (1), nous pouvons introduire, x_c, la fraction de molécule sous forme de complexe chromophore B :

$$x_c = \frac{(B)}{(B) + (BH_2) + (A) + (AH_2)} \qquad (9)$$

nous pouvons également introduire, x_i, la fraction de molécule ne portant plus les deux protons impliqués dans l'équilibre (1) :

$$x_i = \frac{(B) + (A)}{(B) + (A) + (BH_2) + (AH_2)} \qquad (10)$$

Lorsque l'on fait varier l'activité des ions (H^+), de ∞ à 0, x_i varie de 0 à ∞ et corrélativement x_c varie de 0 à une valeur limite x'_c :

pour $(H^+) = 0$ $$x'_c = \frac{(B)}{(B) + (A)} \qquad (11)$$

La variation relative de densité optique (ou de (B)) en fonction de (H^+), que nous avons représentée par Y, est égale à :

$$Y = \frac{x_c}{x'_c} \qquad (12)$$

En utilisant les équations (9) et (11), nous obtenons :

$$Y = x_i \qquad (13)$$

En introduisant dans l'expression (10), les constantes d'équilibre et les constantes de vitesse qui figurent sur le schéma d'équilibre (1), nous obtenons :

$$Y = x_i = \frac{1}{1 + \frac{(H^+)^2}{K_{iB}^2} \frac{1 + k'_b/k'_a}{1 + k_b/k_a}} \qquad (14)$$

La constante d'ionisation, $\overline{K}$, de l'équation (8), dont nous avons déterminé expérimentalement la valeur, a pour expression :

$$\overline{K} = \overline{K}_{iB} \sqrt{\frac{1 + k_b/k_a}{1 + k'_b/k'_a}} \qquad (15)$$

En conclusion nous pouvons dire que :

- la courbe de variation de la densité optique en fonction du pH est identique en tous points à la courbe de titrage des *deux protons* impliqués dans le phénomène,

- la forme de la courbe de titrage des deux groupes ionisables du complexe β-lactoglobuline-cuivre, n'est pas affectée par la transformation A → B du complexe ; elle reste de la forme classique (8).

- la constante K est une constante apparente d'ionisation, dont la valeur dépend de celle des constantes de transformation,

- d'après les relations (6), (7), (8) et (15), la valeur de la constante expérimentale, K, est comprise entre la valeur de $\overline{K}_{iB}$ et de $\overline{K}_{iA}$, c'est-à-dire :

$$p\overline{K}_{iB} < pK = 7{,}75 < p\overline{K}_{iA}$$

Réaction n° 2

Si les essais de réversibilité par acidification sont effectués alors que la réaction du deuxième ordre, caractérisée par une diminution de l'absorption à 375 mμ et par une augmentation de pouvoir rotatoire de la protéine, a évolué de façon sensible, nous constatons comme précédemment une diminution de la densité optique à 375 mμ, mais l'incrément $\Delta[\alpha]_{436}$ apparu au cours de la réaction ne diminue pas lors de la réversion et des agrégats se forment rapidement. Cela semble indiquer qu'au cours de la réaction n° 2 la protéine se transforme irréversiblement et devient insoluble aux pH voisins du point isoélectrique.

5.- EFFET DE LA TEMPERATURE

L'effet de la température sur les deux réactions consécutives intéressant le complexe β-lactoglobuline-cuivre a été étudié entre 2 et 49°C à pH 8,6 - la concentration protéique était de 10^{-4}M pour une concentration en $CuSO_4$ de 1,8 10^{-4}M. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-après :

TABLEAU VIII

	temp. °C	$k_1\ s^{-1} \times 10^3$	$\Delta G^{\neq}$ (cal/mole)	$\Delta H^{\neq}$ (cal/mole)	$\Delta S^{\neq}$ (cal/mole./d°)
Réaction 1	2°	7,1	2700		
	7°	8	2700	1800	-3
	10°	7,6	2700		
	15°	12	2500		
	16°	12	2500	20000	60
	22°	24	2100		
	temp. °C	k_2 l.mole^{-1} . s^{-1}	$\Delta G^{\neq}$	$\Delta H^{\neq}$	$\Delta S^{\neq}$
Réaction 2	16°	1,6	- 280		
	22°	16	-1600		
	27°	19,6	-1700		
	28°	31	-2000	35000	120
	40°	120	-2700		
	42°	300	-3300		
	49°	800	-3900		

Nous remarquerons le caractère faiblement endothermique de la réaction du premier ordre au-dessous de 10°C et au contraire la forte variation d'enthalpie et d'entropie d'activation de cette réaction au-dessus de 10°C. Ce qui prouve que k_1 est la constante de vitesse apparente d'un phénomène complexe.

La seconde réaction qui correspond à la disparition de la bande d'absorption à 375 mμ suivant un processus du second ordre se distingue thermodynamiquement de la première réaction par une plus forte variation d'enthalpie d'activation et par une augmentation importante de l'entropie, ce qui ne doit pas nous surprendre car nous avons vu plus haut (p. 109) que cette réaction est associée à une forte variation du pouvoir rotatoire de la molécule de β-lactoglobuline qui passe à pH 8,6 de 110° à 157° pour $\lambda = 436$ mμ. Cette réaction bimoléculaire semble donc liée à un changement intramoléculaire profond de la β-lactoglobuline.

6.- EFFET DES INHIBITEURS

Pour connaître de façon plus précise le nombre et la nature des sites de fixation de l'ion cuivre impliqués dans le mécanisme des deux réactions consécutives, nous avons eu recours à l'emploi d'inhibiteurs. Les effets produits par ces inhibiteurs ont été observés par spectrophotométrie et par spectropolarimétrie.

L'EDTA (éthylène diamine tétra acétate) :

L'EDTA ajouté au mélange réactionnel agit en tant que chélateur de l'ion Cu^{++} : on observe la disparition instantanée de la bande d'absorption à 375 mμ et l'arrêt de la cinétique de variation du pouvoir rotatoire ; la valeur de $[\alpha]$ reste au niveau atteint (fig. 51).

L'addition d'ions Cu^{++} en excès par rapport à la quantité d'EDTA ajouté permet à nouveau l'évolution des réactions.

L'action de cet inhibiteur prouve donc que la 1ère réaction, la formation du complexe absorbant à 375 mμ, est réversible tandis que la deuxième réaction qui correspond à un changement de structure de la molécule protéique est irréversible.

La Cystéine

La cystéine a la même action que l'EDTA, mais la compétition pour les ions cuivre n'étant pas aussi forte, l'inhibition n'est pas totale et la réaction continue très lentement.

7.- EFFET DES IONS DE METAUX LOURDS : Hg^{++} et Ag^{+}

L'addition d'ion mercurique à la solution cupro-protéique entraîne instantanément la disparition de la bande d'absorption à 375 mμ, mais contrairement à l'effet produit par les chélateurs, l'effet produit par l'ion Hg^{++} est une augmentation de la lévorotation de la protéine; on atteint d'emblée $[\alpha]_{436} = -157°$, valeur que l'on aurait atteinte en fin de réaction après action des ions cuivriques (figure 52).

L'effet produit par les ions mercuriques est proportionnel au nombre d'ions ajoutés, et l'effet maximum est obtenu avec 1 Hg^{++} ajouté pour 2 molécules de β-lactoglobuline (18 000).

Par contre pour produire le même effet avec un cation monovalent : Ag^{+}, il est nécessaire d'ajouter 1 Ag^{+} pour 1 molécule de β-lactoglobuline.

Ces cations Hg^{++} et Ag^{+} ayant une affinité particulièrement forte pour les groupes thiols, on peut penser comme Klotz que le complexe cupro-protéique, donnant la bande d'absorption à 375 mμ et inhibé par ces cations, est dû à une interaction de l'ion cuivre avec un groupe SH. La molécule de β-lactoglobuline possède en effet un groupe SH masqué, il y a donc de bonnes raisons de croire que ce groupe intervient dans la formation de ce complexe. Dans ces conditions le nombre de sites par molécule, responsable des phénomènes observés, est au plus égal au nombre de groupes SH ; soit, un seul par molécule.

Notons cependant que les groupes SH seuls ne donnent pas en présence d'ions cuivre de spectre d'absorption au voisinage de 375 mμ (58), le site aux propriétés si particulières doit donc faire intervenir d'autres groupes en plus du groupe thiol.

Le fait qu'un ion monovalent Ag^{+} par molécule de β-lactoglobuline soit nécessaire pour saturer tous les sites capables de donner avec l'ion cuivre la bande d'absorption à 375 mμ semble confirmer qu'il n'existe qu'un site de cette espèce par molécule. Cependant nous avons vu que 1 Hg^{++} pour 2 molécules de β-lactoglobuline est suffisant pour bloquer tous ces sites ; il n'y a donc qu'un seul site de fixation de l'ion mercurique pour deux molécules de β-lactoglobuline, ce qui implique nécessairement la formation d'un dimère et la participation à ce site des groupes SH appartenant aux deux protomères.

Fig. 53 - Action d'une même quantité d'ion Hg^{++} ($0,7\ 10^{-4}\mu$) à différents stades de l'évolution du complexe lactoglobuline-Cuivre.

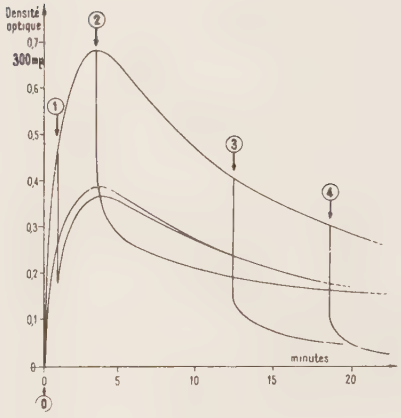
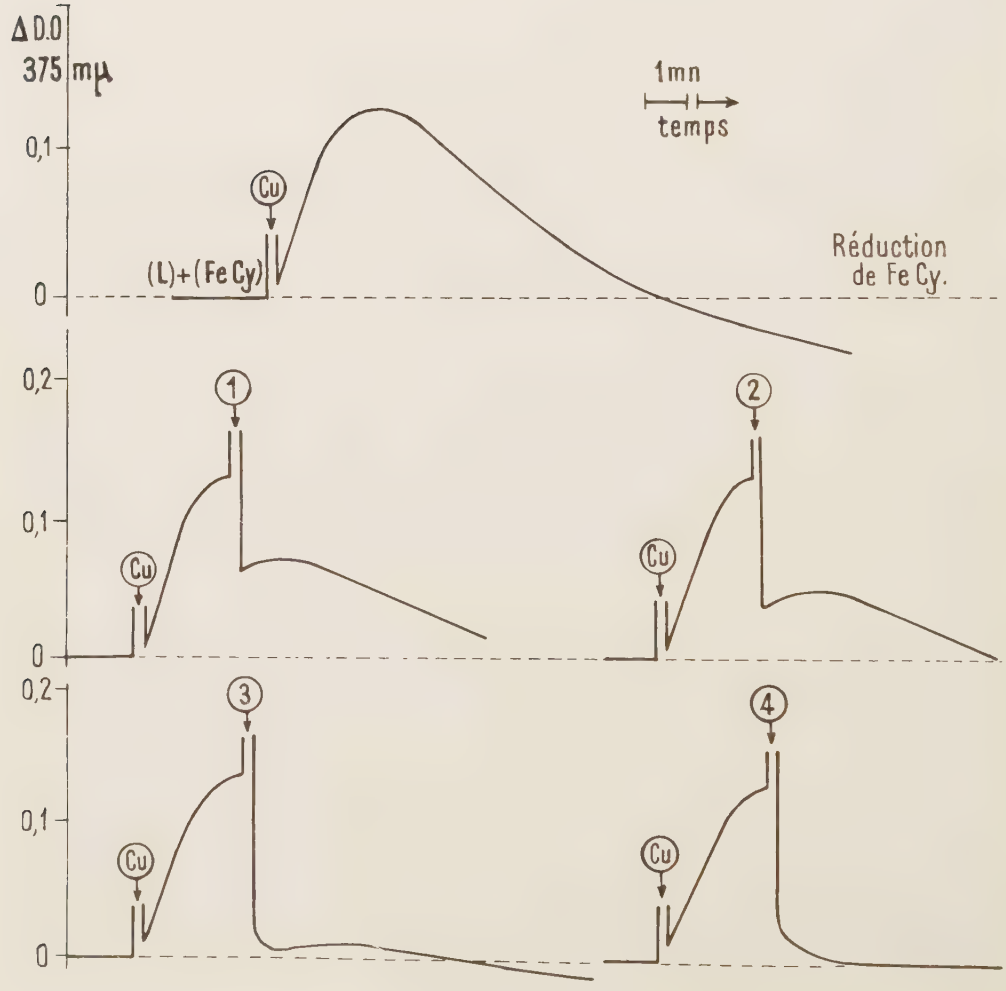


Fig. 54 - Inhibition de la réaction d'oxydation du complexe β-lactoglobuline-Cuivre, en présence de ferrycyanure, par des quantités croissantes d'ion Hg^{++}. β-lactoglobuline, $1,2\ 10^{-4}M$; FeCy. $8,8\ 10^{-4}M$; $CuSO_4$ $3,34\ 10^{-4}M$ et HgCl : 0,185 - 0,37 - 0,55 et 0,74 $10^{-4}M$. en 1 - 2 - 3 et 4.



L'existence de dimère du type P-S-Hg-S-P a été montrée par Hughes (1947) et par Saroff et Choate (1958) dans le cas de la sérumalbumine; il pourrait donc en être de même pour la fixation de l'ion mercurique par la β-lactoglobuline. Cependant cette hypothèse ne peut pas être retenue dans le cas de Cu^{++} car l'expérience montre que la formation du complexe est une réaction unimoléculaire, la dimérisation n'intervenant que dans une seconde phase, elle entraîne alors la disparition du complexe initial qui possédait la bande d'absorption à 375 mμ.

Nous pouvons donc dire qu'il existe *un site unique* sur la molécule de β-lactoglobuline capable de donner avec l'ion Cu^{++} une bande d'absorption à 375 mμ et ce site est localisé au niveau du groupe SH de la protéine.

8.- ROLE DE L'ION CUIVRIQUE AU COURS DE LA REACTION D'ORDRE 2

Comme nous venons de le voir les ions Hg^{++} et Ag^{+} agissent sur le complexe β-lactoglobuline-cuivre en nous donnant apparemment et d'emblée le produit final de la réaction :

$$2\,(\text{L-S-Cu})_B \rightarrow C$$

c'est-à-dire le produit C, caractérisé par son pouvoir rotatoire $[\alpha]_{436} = 157°$, par son absence de bande d'absorption à 375 mμ et par son coefficient de sédimentation $s°_{20} = 2,5$.

On peut se demander si l'action lente des ions Cu^{++} au cours de cette réaction est analogue dans son mécanisme à l'action rapide des ions Hg^{++}.

Pour essayer d'obtenir quelques indications sur ce problème nous avons fait agir une même quantité d'ion Hg^{++} en concentration faible à différentes phases de la réaction complexe β-lactoglobuline-cuivre suivie par spectrophotométrie.

Les conditions expérimentales étaient les suivantes :

β-lactoglobuline A $2,72\ 10^{-4}$M (M = 18 000), tampon véronal pH 8,6
sulfate de cuivre $7,3\ 10^{-4}$M $\mu = 0,1$
chlorure mercurique $0,7\ 10^{-4}$M 22°C

Les résultats obtenus sont représentés par la figure 53 et reportés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU IX

Phase de la réaction à laquelle Hg^{++} est ajouté	Diminution de la densité optique observée à 375 mμ (en %)	Résultat attendu si le Hg^{++} se fixe (a) sur les formes A, B et C	(b) sur les formes A et B seules
0	41 %	41 %	41 %
1	42 %	41 %	41 %
2	41 %	41 %	41 %
3	57 %	41 %	67 %
4	65 %	41 %	87 %

Les résultats obtenus montrent que l'effet produit par une même quantité d'ions Hg^{++} ajoutée au cours de la réaction est proportionnellement plus grand si cette quantité d'ions Hg^{++} est ajoutée vers la fin de la réaction plutôt qu'au début de celle-ci. Il semble donc que le rapport $(Hg^{++})/(SH)$ augmente, ce qui tend à prouver, (Hg^{++}) étant constant, que le nombre de groupes SH susceptibles de fixer les ions mercuriques diminue au cours de la réaction.

Il nous est donc permis de penser que, au cours de cette réaction d'ordre 2, les ions cuivriques catalysent la formation d'un pont disulfure entre molécules de β-lactoglobuline. Cette dimérisation qui s'accompagne d'un changement de pouvoir rotatoire notable serait associée à un changement de structure tertiaire de la molécule.

La dimérisation obtenue en présence d'ion Cu^{++} serait du type :

$$P\text{-}S\text{-}Cu + Cu\text{-}S\text{-}P \rightarrow P\text{-}S\text{-}S\text{-}P + 2\,Cu^{+}$$

Alors que l'action de l'ion Hg^{++} sur cette réaction serait du type :

$$P\text{-}S\text{-}Cu + Hg^{++} + Cu\text{-}S\text{-}P \rightarrow P\text{-}S\text{-}Hg\text{-}S\text{-}P + 2\,Cu^{++}$$

Remarquons que seule la première des deux réactions ci-dessus est une oxydation. Nous pouvons donc espérer, par l'étude de l'action d'un agent oxydant sur ces réactions, vérifier ces hypothèses.

9.- EFFET DE FERRICYANURE DE POTASSIUM

Le ferricyanure de potassium possède une bande d'absorption aux environs de 420 mμ, la forme réduite de ce complexe, le ferrocyanure de potassium ne possède pas de bande d'absorption à 420 mμ. Il est donc aisé de suivre, par spectrophotométrie, la réduction du ferricyanure de potassium au cours d'une réaction.

Dans toutes nos expériences l'ion ferricyanure a été utilisé à une concentration de 10^{-3}M pour des concentrations de β-lactoglobuline de l'ordre de 10^{-4} M.

Nous résumerons ici brièvement les principaux résultats obtenus à 22°C.

L'ion ferricyanure n'a aucune action sur la β-lactoglobuline native à 20°C quelque soit le pH s'il n'y a pas dénaturation de la protéine.

Cependant en présence d'ions cuivre, au-dessus de pH 7, on observe une diminution de la densité optique à 420 mμ qui correspond à la réduction du ferricyanure par les groupes oxydables de la β-lactoglobuline. La cinétique de cette réaction est *d'ordre 1* et le nombre d'ions ferricyanure réduits par molécule de β-lactoglobuline est toujours égal à 2 en fin de réaction.

L'addition d'ions mercuriques inhibe cette réaction d'oxydo-réduction et là encore l'inhibition est totale avec 1 Hg^{++} ajouté pour deux molécules de β-lactoglobuline (figure 54).

Ces résultats confirment les schémas de réactions que nous avions proposés à la fin du précédent paragraphe, mais nous montrent également que les phénomènes sont encore plus complexes que l'on ne s'y attendait.

En effet, comment expliquer qu'*un seul ion mercurique* empêche la réduction de *quatre ions ferricyanure* par le complexe β-lactoglobuline-cuivre ?

Nous pouvons penser qu'il existe dans la molécule de β-lactoglobuline deux groupes oxydables par le ferricyanure en présence d'ion cuivre. Ces deux groupes ne réagissent pas indépendamment l'un de l'autre, ils sont probablement très voisins, l'un de ces deux groupes est le thiol, l'autre pourrait être un résidu tryptophane, car le noyau indole est facilement oxydable dans ces conditions et d'autre part, nous avons mis en évidence l'existence d'un résidu tryptophane au voisinage du thiol dans la β-lactoglobuline (90). Ces deux groupes seraient enfouis à l'intérieur de la protéine et ne seraient accessibles aux réactifs qu'à la faveur du changement de structure réversible de la β-lactoglobuline qui, on l'a vu, implique l'ionisation du COOH anormal au voisinage de pH 7,75.

10.- ROLE DE LA STRUCTURE PROTEIQUE DANS LES PHENOMENES OBSERVES

La bande d'absorption à 375 mμ, n'apparaît plus après addition d'ion cuivre, si la β-lactoglobuline est préalablement soumise à l'hydrolyse trypsique.

On peut également sans briser la structure primaire de la molécule, en faisant agir sur la protéine les ions Hg^{++}, Ag^{+} ou le PCMB (para-chloro-mercuri-benzoate) aux environs de pH 8, ou encore si l'on soumet la β-lactoglobuline à l'action des ions OH^{-} (3 min. à pH 11 et retour à pH 8) ou à l'action de la chaleur (3 min. à 80°C à pH 8), on abolit complètement la propriété qu'avait la molécule de donner avec les ions cuivriques une bande d'absorption à 375 mμ.

L'effet commun des divers agents employés est de modifier la structure tertiaire de la molécule protéique. Il apparait qu'au cours de ces traitements le site spécifique et très particulier de l'ion Cu^{++} a été détruit.

L'intégrité d'une certaine structure tertiaire doit donc être indispensable à la formation de ce site, qui ne peut se faire qu'au-dessus de pH 7, lorsqu'une partie notable des molécules de β-lactoglobuline est réversiblement dissociée et transformée.

Notons que ni l'action de la trypsine, ni l'action brève des ions OH^{-} et de la chaleur n'ont fait disparaître les groupes SH de la protéine, cependant les groupes SH sont après ces traitements directement oxydables par le ferricyanure en l'absence d'ion cuivrique.

Le groupe SH démasqué lors du changement de structure est donc incapable de donner avec l'ion cuivre le mystérieux spectre d'absorption à 375 mμ.

Le fait que Klotz n'ait pas observé le spectre à 375 mμ du complexe β-lactoglobuline-cuivre pourrait être dû à ce qu'il a utilisé les mêmes conditions expérimentales que pour la sérumalbumine bovine : c'est-à-dire, soit un pH inférieur à 7 soit des concentrations en ion cuivre trop élevées ce qui aurait rendu la disparition du spectre très rapide.

CHAPITRE VII

TRANSFORMATIONS IRREVERSIBLES DE LA β-LACTOGLOBULINE

I.- INTRODUCTION

Les changements de structures irréversibles de la β-lactoglobuline ont depuis longtemps fait l'objet de nombreuses études. Ces changements de structure sont généralement désignés par le terme vague de dénaturation que les auteurs précisent toujours en indiquant la nature de l'agent physique ou chimique employé pour obtenir cette dénaturation. Différents modes de dénaturation de la β-lactoglobuline ont été étudiés, on distingue :

La dénaturation thermique (Briggs et al 1945, Larson et al 1952, Dupont 1962).
" alcaline (Groves et al 1951, Bunville 1959).
" par l'urée (Shellman 1958, Tanford et al 1961).
" par les détergents (Hill et al 1956).
" par les solvants organiques (Tanford et al 1960).
" par les ions de métaux lourds (Pantaloni 1962).
" par moussage (Lauwers 1961).
... etc...

Toutes ces dénaturations ont en commun une modification considérable des propriétés caractéristiques de la protéine native. Les propriétés généralement utilisées pour étudier ces dénaturations sont : la diminution de solubilité de la protéine au point isoélectrique, l'augmentation de viscosité, la variation de volume de la solution protéique, le changement de masse moléculaire, la variation de la vitesse de migration électrophorétique, la modification de la courbe de titrage de la protéine, l'augmentation de la lévorotation, la modification du spectre d'absorption de la protéine, le démasquage de certains groupes, ... etc...

Il était généralement admis ces dernières années qu'il existait, pour les protéines globulaires, une forme native unique et bien définie et que la dénaturation était due à de nombreuses modifications structurales se traduisant par l'apparition irréversible d'un grand nombre de formes moléculaires différentes. La nature de ces modifications semblaient dépendre de la nature de l'agent dénaturant ce qui justifiait la classification des différents types de dénaturations.

Il nous a semblé qu'il serait préférable de classer les différentes formes moléculaires obtenues au cours des diverses dénaturations par leurs caractéristiques physico-chimiques plutôt que par les moyens utilisés pour les obtenir. Cette

classification laisse supposer que les formes obtenues sont peu nombreuses et que chacune d'elles peut être caractérisée séparément. C'est ce que nous allons essayer de montrer dans le cas de la β-lactoglobuline.

Mais avant toute chose, qu'appelons-nous forme native d'une protéine ? D'après ce que nous connaissons des changements de structure reversibles de la β-lactoglobuline, il semble difficile de définir une forme native, car la protéine, dans des conditions physico-chimiques proches de celles du milieu biologique, existe sous plusieurs formes moléculaires en équilibre rapide; aucune ségrégation n'est possible. *En conséquence on devrait pouvoir appeler, molécule à l'état natif toute molécule capable de présenter, dans des conditions physico-chimiques données toutes les conformations possibles de l'espèce moléculaire considérée.* C'est là une définition large, il est plus commode de distinguer de façon purement conventionnelle une structure de référence que *l'on appellera structure native* et qui sera par exemple *celle de la protéine au voisinage de son point isoélectrique.*

Tanford désigne par la lettre N cette structure pour la β-lactoglobuline et par la lettre R la structure de la molécule réversiblement transformée qui apparaît entre pH 6 et pH 9. Cette transconformation réversible est appelée par cet auteur transition $N \rightleftarrows R$; nous avons montré que cette transconformation est un phénomène complexe car elle est liée à la dissociation moléculaire, il serait donc préférable d'écrire : transition $N_2 \rightleftarrows 2R$, si nous voulons mettre en évidence le caractère complexe de cette transition.

Au cours des différentes dénaturations, la β-lactoglobuline de forme R se transforme irréversiblement et l'on obtient, nous le verrons, une protéine de forme bien déterminée que nous désignerons par la lettre S, car un groupe SH est impliqué dans cette transconformation que nous appellerons : transition $R \rightarrow S$. Nous essaierons de montrer que cette transition irréversible est une étape commune à différentes dénaturations. Nous étudierons ensuite cette transition d'un point de vue thermodynamique, nous verrons enfin que l'on peut atteindre d'autres étapes dans la voie d'une plus grande dénaturation pour aboutir finalement à l'agrégation de la protéine.

II.- TRANSCONFORMATION IRREVERSIBLE $R \rightarrow S$

A.- CHANGEMENT DE STRUCTURE PROVOQUE PAR LES IONS DE METAUX LOURDS

1.- ETUDE POLARIMETRIQUE

L'addition d'ions de métaux lourds, Hg^{++}, Ag^{+} ou des ions organomercuriels tels que le p-chloromercuribenzoate de sodium (PCMB) n'ont aucune action notable sur les propriétés rotatoires de la β-lactoglobuline au-dessous de pH 6, lorsque la protéine se trouve dans la conformation dite native, N_2. Par contre si l'on fait agir ces ions à des pH supérieurs à 6, on observe une augmentation lente et irréversible du pouvoir rotatoire de la protéine. Au voisinage de pH 8, l'action des ions Hg^{++}, Ag^{+} et PCMB est beaucoup plus rapide, on peut considérer qu'à pH 8,6 l'effet est instantané.

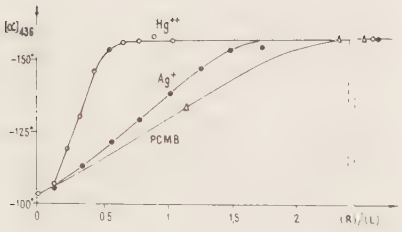


Fig. 55 - Variation du pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline A en fonction de concentrations croissantes d'ions Hg^{++}, Ag^{+} et de P C M B. (tampon véronal $\mu = 0,1$ - pH 8,3 à 20° C).

(R)/(L) représente le rapport de la concentration du réactif ajouté par mole de β-lactoglobuline (M = 18.000).

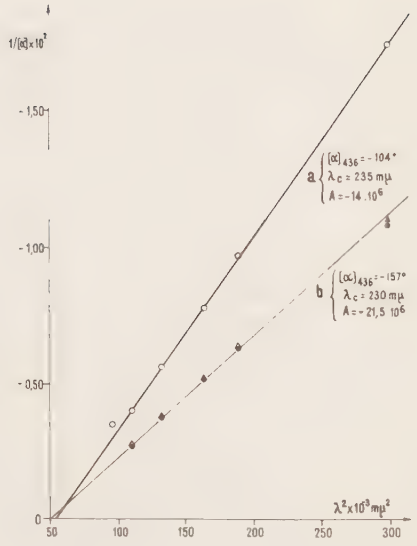


Fig. 56 - Dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline B à pH 8,4 en tampon véronal $\mu = 0,1$.

a - en absence de métaux lourds.

b - en présence d'ion Hg^{++} ou Ag^{+} (effet maximum) ou après action de Cu^{++}.

La figure 55 montre l'effet produit par des concentrations croissantes de chlorure mercurique, de nitrate d'argent et de PCMB sur le pouvoir rotatoire de la β-lactoglobuline A en solution aqueuse en présence de tampon véronal $\mu = 0,1$ pH 8,3 à 20° C.

Dans les trois cas les courbes de la figure 55 présentent un palier de saturation ou d'effet maximum qui correspond à $[\alpha]_{436} = -157°$, nous avions déjà obtenu cette même valeur de pouvoir rotatoire après action des ions cuivre sur la β-lactoglobuline : *ce changement de pouvoir rotatoire est donc indépendant de la nature de l'ion qui le produit.* Remarquons cependant que 0,5 ion Hg^{++} par mole de lactoglobuline sont suffisants pour produire la transformation totale alors qu'il faut un peu plus de 1 ion Ag^{+} pour produire le même effet. Ce résultat confirme un fait déjà acquis (page 120) à savoir qu'un groupe SH par molécule de lactoglobuline est étroitement impliqué dans cette transconformation irréversible. Pour essayer de mieux comprendre à quoi correspond ce changement de pouvoir rotatoire nous allons maintenant analyser les résultats obtenus par spectropolarimétrie.

2.- ETUDE SPECTROPOLARIMETRIQUE

Nous avons comparé la dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline avant et après action des ions Hg^{++}, Ag^{+} et Cu^{++} en tampon véronal $\mu = 0,1$ à pH 8,3 et à 20° C.

Les résultats obtenus sont les suivants :

La dispersion rotatoire des β-lactoglobulines transformées et non transformées est correctement représentée par l'équation de Drude à un terme voir figure 56.

Les paramètres rotatoires caractéristiques de deux formes sont donnés ci-dessous :

	$[\alpha]_{436}$	$[\alpha]_D$	A	λ_c
β-lactoglobuline *non traitée*	-104°	-47°	-14.10^6	235 ± 2 mμ
β-lactoglobuline *traitée par* Hg^{++} Ag^+ ou Cu^{++}	-157°	-74°	-21.10^6	230 ± 2 mμ

(les valeurs de $[\alpha]_D$ ont été obtenues par extrapolation)

Le passage d'une forme à l'autre est caractérisé par une variation importante de la constante de dispersion rotatoire A et par une très faible variation de λ_c.

Il semble donc que cette transconformation modifie peu ou pas le contenu en hélice déjà très faible de la β-lactoglobuline mais modifie surtout l'interaction de la protéine avec le solvant (Cf. Chap. III). Cette interprétation est confirmée par le fait que la protéine transformée est moins soluble que la protéine non transformée. De plus nous allons voir que les modifications du spectre d'absorption de la protéine au cours de cette transition corrobore cette hypothèse.

3.- ETUDE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE DIFFERENCES

La molécule de β-lactoglobuline transformée, que nous appellerons β-lactoglobuline de forme S, présente vis-à-vis de la forme R qui n'a pas subi la transconformation irréversible, un spectre de différence caractéristique (figure 57) ; ce spectre ne dépend pas de la nature de l'ion qui provoque la transconformation ; là encore, l'addition de quantités croissantes d'ion Hg^{++} ou Ag^+ à une solution de β-lactoglobuline, produit d'abord une modification du spectre, proportionnelle à la quantité d'ions ajoutés. On obtient ensuite un effet maximum pour un rapport $(Hg^{++})/(L) = 0,5$ ou pour $(Ag^+)/(L) = 1$. Si l'on compare l'effet observé par spectrophotométrie et par polarimétrie, on constate, figure 58, que les points expérimentaux se placent sur une même courbe : ceci montre que la modification du spectre d'absorption et le changement de pouvoir rotatoire de la protéine sont deux aspects d'un même phénomène, d'un même changement de structure de la protéine. Cependant le changement de propriétés rotatoires et la modification du spectre nous apportent des renseignements de nature différente :

La variation de pouvoir rotatoire de la protéine traduit un phénomène global : la variation de pouvoir rotatoire de tous les résidus d'amino-acide impliqués dans la transconformation. Par contre la modification du spectre d'absorption est un phénomène sélectif, car elle traduit seulement des modifications intervenant au niveau des résidus aromatiques. Ceux-ci étant généralement peu nombreux, 2 tryptophanes et 4 tyrosines pour la β-lactoglobuline, le changement de structure de la protéine peut être en quelque sorte localisé topographiquement en un point de la molécule.

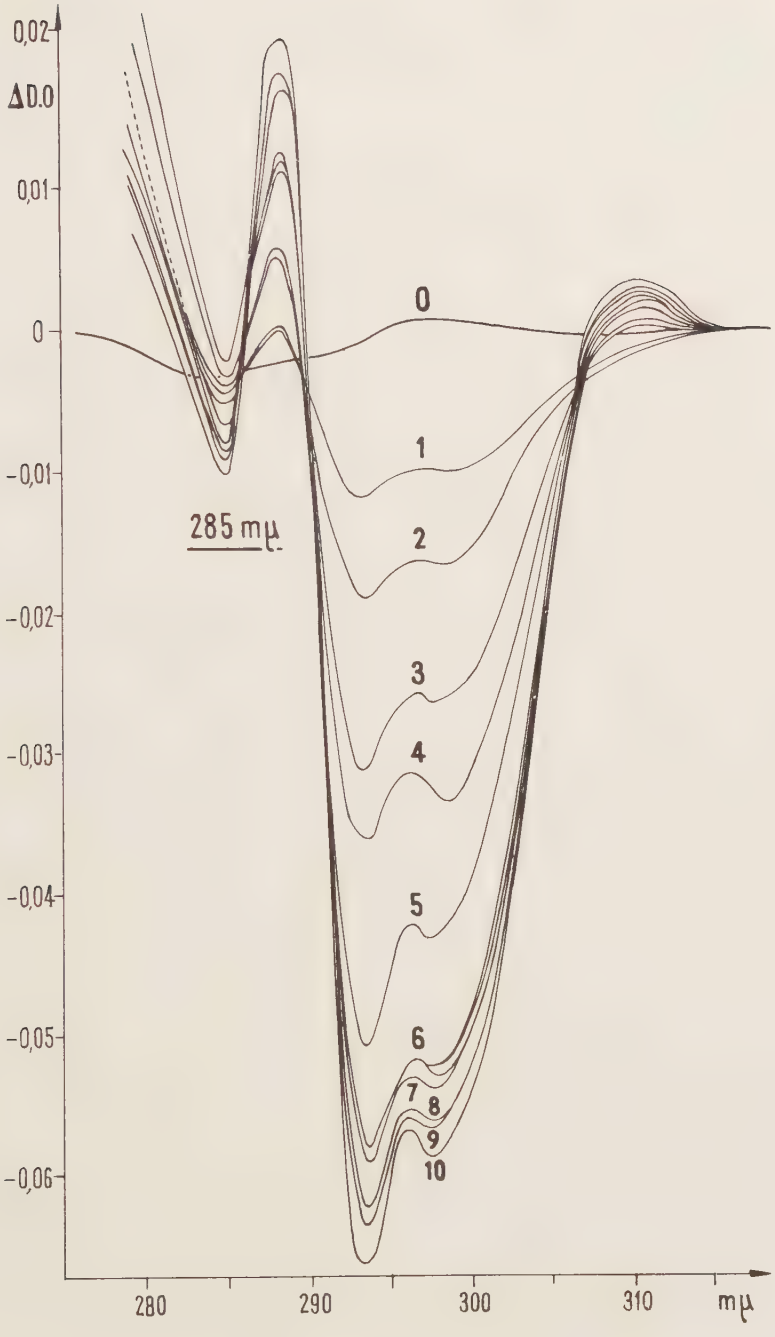


Fig. 57 - Spectres de différences de β-lactoglobuline A, (0,8 10^{-4}M, pH 8,6 en tampon véronal, à 20° C) en présence de concentrations croissantes d'ions Hg^{++}.

$\Delta(Hg^{++}) = 0,8\ 10^{-5}$M entre chaque spectre.

La variation d'absorption et de pouvoir rotatoire semblent avoir la même origine : une modification du milieu perturbant les transitions électroniques dans le proche et le lointain ultraviolet; les premières étant responsables essentiellement de l'absorption de 2 500 à 3 000 Å et les autres, comprenant les transitions actives, responsables du pouvoir rotatoire.

La différence de spectre entre la β-lactoglobuline S et la β-lactoglobuline R comme le montre la figure 57 présente un maximum à 293 mμ avec un épaulement bien marqué à 298 mμ, un point isobestique à 290 mμ et un maximum secondaire à 285 mμ. Ce spectre de différence indique qu'au moins un des deux résidus tryptophane de la molécule de β-lactoglobuline a subi un effet hypochrome et hypsochrome, tout comme si ce chromophore passait, lors de la transition R → S, d'un milieu peu polaire, région hydrophobe à l'intérieur de la molécule, à un milieu plus polaire tel que le solvant aqueux libre (29) (118) (voir p. 32). Une intéraction directe entre le groupe SH également impliqué dans cette transconformation et le résidu tryptophane n'est pas à écarter (46).

Ce résidu tryptophane joue en quelque sorte, pour l'expérimentateur, le rôle d'un marqueur, d'un indicateur "coloré" naturel qui montre que la protéine a subi à son niveau un changement de structure qui pourrait être l'éclatement d'une structure du type micellaire. L'apparition de groupes hydrophobes au contact du solvant aqueux favorise les interactions intermoléculaires et peut expliquer la diminution de solubilité de la β-lactoglobuline S par rapport à la β-lactoglobuline N ou R; le démasquage de ces groupes hydrophobes lors de la transconformation peut également rendre compte de l'augmentation de la lévorotation de la protéine (118).

Si maintenant l'on compare, spectrophotométriquement, une solution de β-lactoglobuline S, à pH 6, à une solution de β-lactoglobuline N de même concentration et au même pH, on observe un spectre de différence (fig. 78) qui présente en plus des pics situés à 293 et 285 mμ caractéristiques du démasquage du tryptophane, des pics à 286 et 278 mμ caractéristiques du démasquage du résidu tyrosine (le pic à 286 mμ se superpose à celui du tryptophane à 285 mμ). Ce résidu tyrosine est normalement démasqué réversiblement lors de la transition $N_2 \rightleftarrows 2R$, il est irréversiblement démasqué dans la lactoglobuline S. Nous pouvons donc représenter le mécanisme global de la transconformation irréversible par le schéma suivant :

$$N_2 \rightleftarrows 2\,R \rightarrow 2\,S$$

4.- TITRAGE ELECTROMETRIQUE

Nous avons effectué le titrage électrométrique de la β-lactoglobuline B, (C = 3,5 mg/ml, μ = 0,1), en absence d'ion de métaux lourds et en présence d'ion Hg^{++} et Cu^{++} (le rapport (métal)/(L) était égal à 0,4).

Les résultats obtenus sont représentés par les courbes de la figure 59. L'examen de ces courbes montre qu'il se produit au cours du titrage une modification irréversible : en effet le titrage "retour" est différent du titrage "aller" effectué dans le sens des valeurs croissantes du pH. La différence observée correspond au titrage d'une charge supplémentaire par molécule lors du titrage retour. Cette charge supplémentaire est vraisemblablement due au fait que le carboxyle anormal impliqué dans la transconformation $N_2 \rightleftarrows 2R$ est ici irréversiblement démasqué, comme il l'est au cours de la dénaturation alcaline (73). Le démasquage irréversible du carboxyle anormal se produit en même temps que le démasquage irréversible du résidu tyrosine, mis en évidence plus haut, ces deux groupes étant étroitement impliqués dans la transition réversible $N_2 \rightleftarrows 2R$, comme nous l'avons vu chapitre IV, 2ème partie.

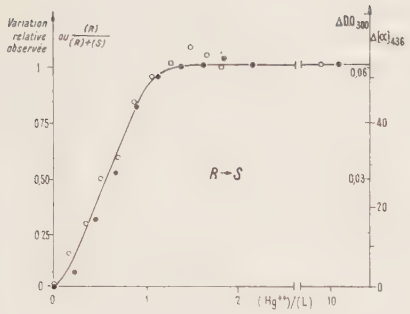


Fig. 58 - Variation comparée du pouvoir rotatoire et de l'absorbance de la β-lactoglobuline en fonction de concentrations croissantes d'ion Hg++ ajoutées à la solution protéique.

- Pouvoir rotatoire à 436 mμ,
- Densité optique à 300 mμ.

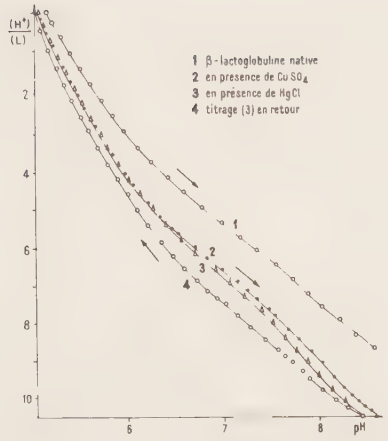


Fig. 59 - Courbes de titrage de la β-lactoglobuline en absence et en présence de Cu++ ou Hg++ ; (Métal)/(L) = 0,4.

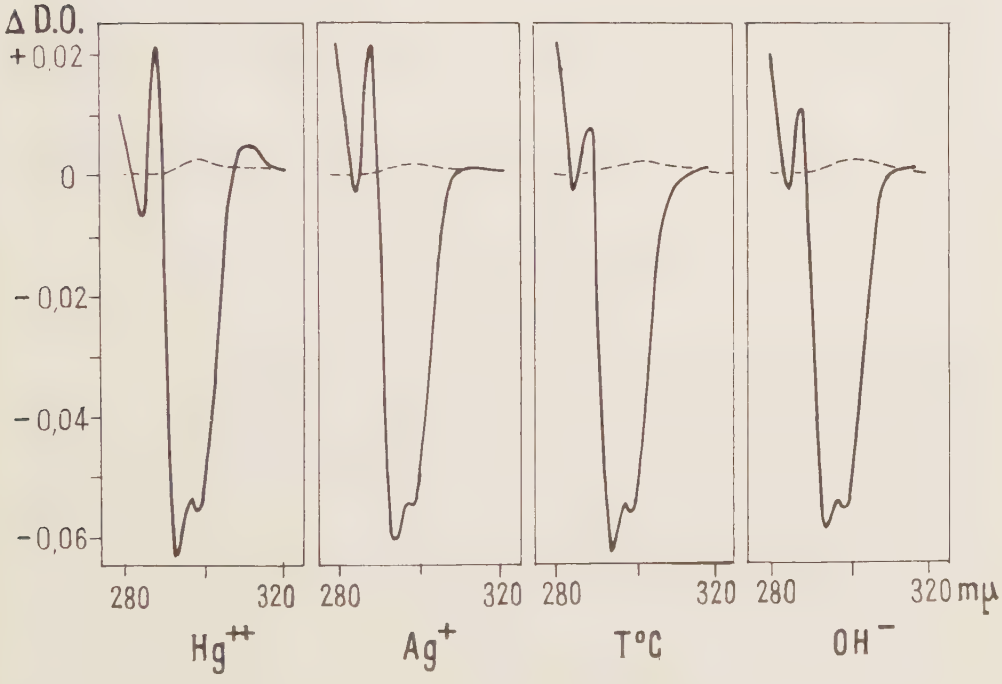


Fig. 60 - Spectres de différences de la β-lactoglobuline A (0,8 10−4M à pH 8,6 en tampon véronal 20° C) après traitement par :

les ions Hg^{++}
les ions Ag^{+}
les ions OH^{-} (3 minutes à pH 12 et retour à pH 8,6)
la chaleur (3 minutes à 80° C et retour 20° C).

5.- VARIATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

Les mesures des coefficients de sédimentation par ultracentrifugation à pH 8,3 en tampon véronal $\mu = 0,1$ à 20°, ont été faites pour des concentrations protéiques comprises entre 2,8 et 7,6 mg/ml avant et après traitement par les ions de métaux lourds.

Les résultats obtenus sont les suivants :

avant traitement : $s = 2,1$ S

après traitement par : $\begin{cases} Hg^{++} & s = 2,6 \text{ S} \\ Ag^{+} & s = 2,6 \text{ S} \\ Cu^{++} & s = 2,5 \text{ S} \end{cases}$

Ces résultats doivent être interprétés avec beaucoup de circonspection : en effet, il a été montré par C. Georges, S. Guinand et J. Tonnelat (1962), que la β-lactoglobuline existe en état d'équilibre rapide, monomère-dimère, ne donnant qu'un seul pic de sédimentation par ultracentrifugation analytique. La masse moléculaire moyenne de la protéine et son coefficient de sédimentation sont donc fonction de la concentration protéique de la solution. Pourtant il est difficile de prouver que sous l'action des ions de métaux lourds se produit ou non une dimérisation de la molécule de β-lactoglobuline car avant le traitement préexiste déjà une quantité notable de dimère en équilibre réversible avec le monomère. Néanmoins les résultats que nous avons obtenus nous semblent suffisamment significatifs pour que l'on puisse dire qu'il se produit une dimérisation de la β-lactoglobuline au cours de l'action des ions de métaux lourds.

En effet après transformation irréversible de la β-lactoglobuline nous obtenons $s_o = 2,6$ S, or d'après C. Georges et S. Guinand la constante de sédimentation du dimère seul, à l'état natif, serait de 3 S. Il est raisonnable de penser que le changement de conformation qu'a subi ici la molécule a pu modifier la valeur du rapport de friction et expliquer ainsi cette différence.

Nous citerons en faveur de cette dimérisation irréversible ($2S \rightarrow S_2$) associée à un changement profond de la structure tertiaire de la protéine, les travaux de N. Binon, G. Préaux et R. Lantie (1963), qui reprenant nos expériences, ont étudié la séparation, sur colonne de Séphadex G 100, des produits de transformation des β-lactoglobulines A et B par les ions Hg^{++} et Cu^{++}. Ces auteurs montrent que *la protéine transformée s'élue avant la protéine non transformée,* et que la concentration du produit rapide sur Séphadex croît en fonction de la concentration en Hg^{++} parallèlement à l'augmentation du pouvoir rotatoire que nous avions constatée (Pantaloni (1962)). Ces auteurs constatent que leurs résultats sont en accords avec les nôtres mais pensent cependant qu'il n'y a pas dimérisation de la protéine. Comment expliquer alors qu'un seul ion Hg^{++} produise la transformation de deux molécules de β-lactoglobuline (18000) comme cela a été confirmé par leurs expériences ?

6.- CONCLUSIONS

En conclusion nous pouvons dire que le produit de transformation de la molécule de β-lactoglobuline par des ions de métaux lourds est caractérisé par rapport à la molécule non transformée : par son spectre de différences, par son pouvoir rotatoire $[\alpha]_{436} = -157°$, par son diagramme d'élution chromatographique sur Séphadex

G 100, par sa courbe de titrage ne présentant plus de COOH anormal, par sa constante de sédimentation plus élevée, et, d'une autre façon, par le fait que la protéine transformée n'est plus capable de présenter la transition réversible : $N_2 \rightleftarrows 2R$; en outre cette protéine ne donne plus, en présence de Cu^{++}, la bande d'absorption à 375 mμ. Tous ces faits mettent en évidence l'existence d'une transition irréversible, que nous appelons transition R → S. Cette transition s'intègre dans un mécanisme complexe :

$$N_2 \qquad 2R \rightleftarrows 2S \rightarrow S_2$$

Ce schéma de réaction montre que la transconformation réversible : $N_2 \rightleftarrows 2R$ que subit la β-lactoglobuline entre pH 6 et 9 à 20°C est un changement de structure préalable et nécessaire pour que la transconformation irréversible R → S puisse s'effectuer. La transconformation réversible : $N_2 \rightleftarrows 2R$ rendrait accessible le groupe SH, jusqu'alors masqué, aux réactifs caractéristiques des thiols, et permettrait ainsi la transformation irréversible de la protéine.

Cependant G. Préaux *et al* (1964) mettent en doute cette hypothèse en faisant remarquer que des réactifs spécifiques des thiols réagissent de façon stoechiométrique avec la β-lactoglobuline (mole à mole) pour des valeurs de pH inférieures à 8 ; la chloromérodrine réagirait de façon complète dès pH 6,3, le PCMB dès pH 7,9, aux pH inférieures, 6,8 et 6, la réaction est beaucoup plus lente. Nous avons observé le même phénomène avec les ions cuivriques et mercuriques mais nous voyons là au contraire une preuve en faveur du mécanisme que nous proposons : en effet, il nous semble normal qu'un réactif ayant une très forte affinité pour les thiols puisse réagir avec le groupe SH accessible de la β-lactoglobuline R même si celle-ci est à une concentration très faible comme cela est le cas à pH 6 ; la réaction doit être plus lente mais peut parfaitement être complète.

B.- CHANGEMENT DE STRUCTURE PROVOQUE PAR ACTION DES IONS OH^- ET PAR ACTION DE LA CHALEUR

Nous venons de voir que l'on peut caractériser, par une série de propriétés physiques ou physicochimiques, la forme S de la molécule de β-lactoglobuline obtenue par action des ions de certains métaux ou par action de certains réactifs spécifiques des groupes SH. Nous allons montrer que l'on retrouve les mêmes propriétés après avoir traité la β-lactoglobuline par des agents non spécifiques tels que la chaleur et les ions OH^-.

Nous avons, pour comparer les produits de transformation irréversible de la β-lactoglobuline par différents agents, opéré de la façon suivante :

Nous avons divisé en plusieurs lots, une solution aqueuse de β-lactoglobuline A en tampon véronal de pH 8,6 et $\mu = 0,1$. Une partie de ces lots nous ont servi de référence, les autres ont été traités :

par les ions Hg^{++}
par les ions Ag^+
par les ions OH^- (3 minutes à pH 12 et retour à pH 8,6)
par la chaleur (3 minutes à 80°C et retour à 20°C).

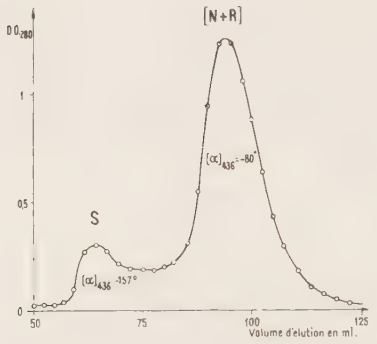


Fig. 61 - Diagramme d'élution sur Séphadex G 100 de la β-lactoglobuline A, chauffée 5 minutes à 76°C à pH 7 en tampon phosphate $\mu = 0,1$.

Les propriétés des solutions ainsi traitées et des solutions témoins, ajustées à la même concentration, sont ensuite comparées :

Les spectres de différences obtenus dans ces quatre cas sont représentés figure 60. Lorsque l'on compare ces spectres, la ressemblance est à ce point évidente que l'on est tenté de chercher d'abord les différences : celles-ci sont faibles et, quoique non négligeables, on peut cependant dire en première approximation que ces spectres sont qualitativement identiques.

Dans tous les cas le pouvoir rotatoire des lactoglobulines ainsi obtenues est quasiment identique $[\alpha]_{436} = 157° \pm 2°$.

Les variations de pH que nous avons observées après le traitement thermique de la β-lactoglobuline en solution non tamponnée, traduisent une modification de la courbe de titrage qui correspond au démasquage irréversible du carboxyle anormal. Le même phénomène a été mis en évidence par Tanford *et al* (1959) après dénaturation alcaline de la β-lactoglobuline.

Nous avons effectué des analyses chromatographiques sur Séphadex G 100 de la β-lactoglobuline traitée par la chaleur à 76°C pendant des temps différents : nous avons observé comme Binon *et al* dans le cas de la β-lactoglobuline traitée par Cu^{++} et Hg^{++}, l'existence de deux pics d'élution (fig. 61). Le premier produit élué correspond à la protéine transformée irréversiblement et le second à la protéine non transformée. Le rapport des concentrations de ces deux produits dépend de la durée du traitement thermique.

Nous verrons plus loin que le coefficient de sédimentation, s°_{20}, de la β-lactoglobuline soumise à l'action de la chaleur est de 2,9 S, il s'est donc formé un dimère.

Nous avons constaté qu'après avoir subi l'action de la chaleur, de la soude ou encore de l'urée, la β-lactoglobuline réduit rapidement le ferricyanure de potassium à raison de un ion par molécule de β-lactoglobuline (18 000), nous le verrons plus loin. Cette réaction est inhibée stoechiométriquement par 0,5 ion Hg^{++} par molécule de β-lactoglobuline. On peut donc dire que le groupe SH masqué dans la protéine native a été démasqué au cours de la transconformation irréversible sous l'action de ces divers agents.

Nous pensons avoir montré qu'il existe suffisamment de similitudes dans les propriétés des produits de transformation de la β-lactoglobuline par des ions de métaux lourds, par les ions OH^- ou par action de la chaleur pour affirmer que dans tous les cas nous avons obtenu la même transformation structurale de la protéine. Ce résultat serait moins étonnant si nous avions, dans tous les cas, atteint l'étape ultime de la désorganisation de la molécule, c'est-à-dire la pelote statistique. Mais il n'en est rien, la plupart des chromophores de la protéine sont encore masqués, la valeur des paramères rotatoires, $[\alpha]_D = -74°$ et $\lambda_c = 230$ mμ, est encore très différente de celle que l'on obtient par dénaturation totale de la β-lactoglobuline en présence d'urée 8M, $[\alpha]_D = -110°$ et $\lambda_c = 212$ mμ (102). Nous avons donc obtenu une forme moléculaire stable, irréversiblement transformée, et possédant encore un certain degré d'organisation. Le fait que l'on puisse obtenir cette forme moléculaire par action d'agents très différents semble indiquer qu'il s'agit là d'une forme unique que nous avons appelée *forme S.*

Cette structure particulière est donc une étape commune à différents processus de dénaturation de la β-lactoglobuline, y compris sans doute la dénaturation par les détergents ou par l'urée (4M) que nous n'avons pas étudiée mais les observations à ce sujet faites par Hill *et al* (1956) et par Shellman (1958) nous permettent de penser qu'il pourrait en être ainsi.

C.- ETUDE THERMODYNAMIQUE DE LA TRANSITION R → S

1.- INTRODUCTION

La transition R → S, nous l'avons vu, peut être obtenue par action d'agents très différents :

L'utilisation des ions de métaux lourds, par leur grande spécificité, nous a permis de connaître la nature et le nombre des groupes jouant un rôle déterminant dans cette transition ; l'étude de la transition R → S en fonction de la température et du pH de la solution, en absence de tout agent ayant une action spécifique, va permettre d'atteindre le mécanisme cinétique de cette réaction et de déterminer la valeur des constantes thermodynamiques relatives au processus d'activation.

La transition R → S étant caractérisée par la modification d'un grand nombre de propriétés de la molécule, nous avons la possibilité d'utiliser plusieurs méthodes ou techniques différentes pour suivre cette réaction. La spectrophotométrie de différence se présente, ici, comme la plus sensible et la plus sélective de ces techniques : elle nous permet d'employer des concentrations protéiques très faibles, couramment de l'ordre du mg/ml, et de pouvoir, éventuellement, dissocier plusieurs phénomènes concomitants. Nous avons donc essentiellement étudié la cinétique de la réaction R → S, par spectrophotométrie, en suivant l'apparition, au cours du temps, du spectre de différence qui caractérise la forme S par rapport à la forme R.

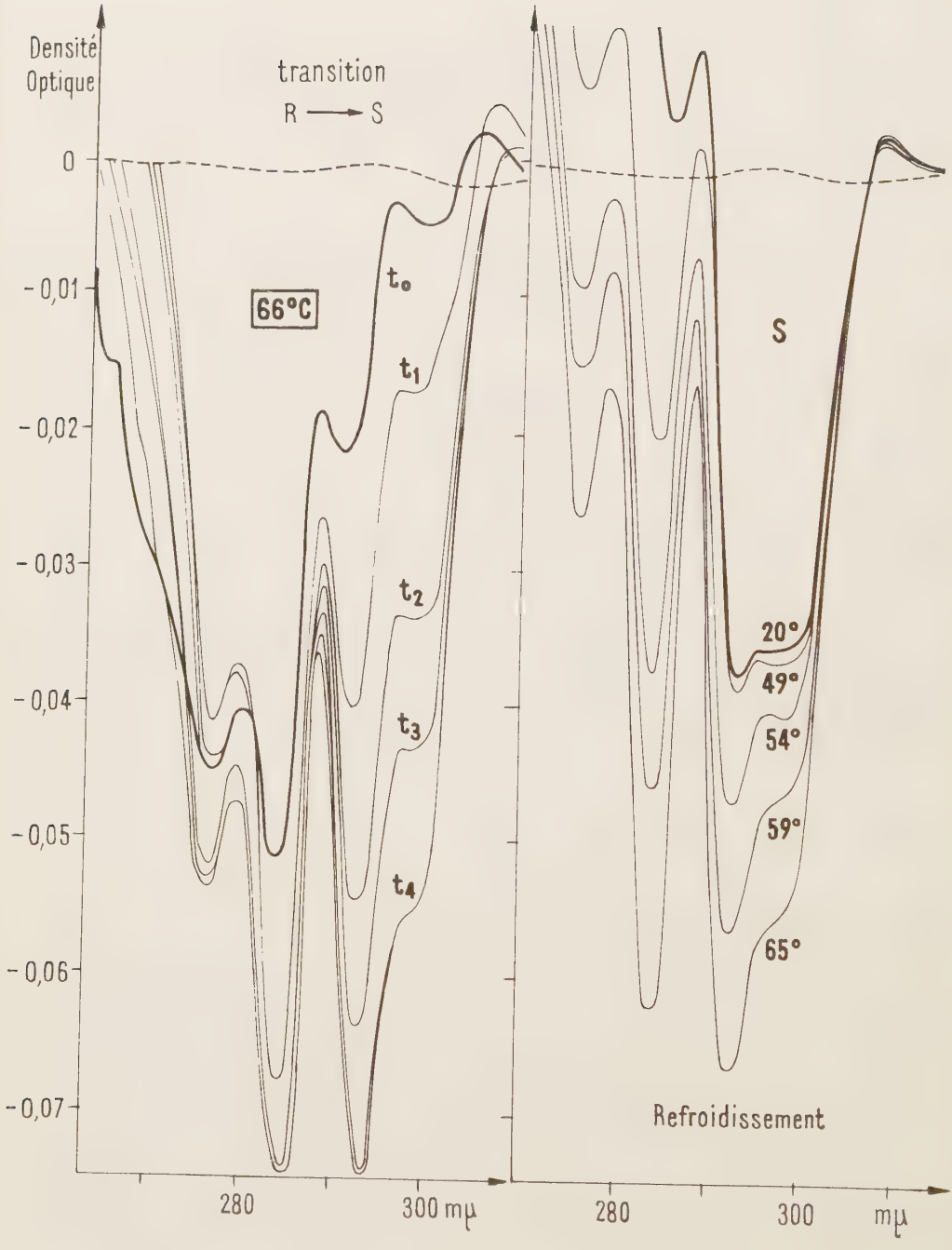


Fig. 62 - Modification lente du spectre d'absorption de la β-lactoglobuline A.pH 8,2, C = 1,55 mg/ml, à 66°.

Fig. 63 - La modification lente du spectre subsiste après refroidissement. La modification instantanée (t_o) est entièrement réversible.

L'étude de la réaction a été faite en fonction de la température, de la concentration protéique, du pH et de la force ionique de la solution.

2.- EFFET DE TEMPERATURE SUR LA CINETIQUE DE LA TRANSITION R → S

Si l'on modifie la température d'une solution de β-lactoglobuline en maintenant la solution de référence à une température constante, on observe un spectre de différence négatif présentant deux pics principaux à 284 et 278 mμ (fig. 62), caractéristiques du démasquage de résidus tyrosine. Les variations de densité optique, observées à 284 mμ, sont aussi rapides que les variations de température de la solution, celles-ci peuvent être de 1°C par seconde. Si l'on ramène la solution chauffée à la même température que la solution de référence, le spectre de différence disparaît complètement. Cet effet apparemment instantané de la température est donc parfaitement réversible ; il correspond pour une part à la transition réversible $N_2 \rightleftarrows 2R$ (Cf. Chap. IV) dont l'équilibre est déplacé par effet de la température et pourrait pour une autre part être dû à une expansion de la molécule et à un effet non spécifique de la température sur les chromophores au contact du solvant aqueux (Cf. Chap. IV).

A cette modification "instantanée" et réversible du spectre d'absorption de la protéine, se surajoute aux températures élevées, supérieures à 60°C, le spectre de différence caractéristique de la transition R → S. A température constante ce spectre apparaît avec une vitesse mesurable, d'autant plus grande que la température est plus élevée ; il se distingue du premier par la position de ses maximums de différence situés à 300 et 295 mμ (fig. 53). Après refroidissement (fig. 63) seul demeure le spectre caractéristique de la transition irréversible R → S.

Nous avons étudié la cinétique de la réaction R → S en enregistrant à 300 mμ, en fonction du temps, les variations de densité optique de la β-lactoglobuline à une température donnée et dans différentes conditions :

a.- tout d'abord en faisant varier la concentration protéique, de 1 mg/ml à 69°C en tampon phosphate, $\mu = 0,1$ et pH 6,9. La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration protéique de la solution : la réaction est donc du premier ordre.

b.- puis à différentes températures de 68 à 80°C pour une concentration en β-lactoglobuline B de 1,7 mg/ml en tampon phosphate $\mu = 0,1$ et pH 6,9. On obtient une représentation linéaire de ces différentes cinétiques en portant graphiquement 1/C en fonction du temps (fig. 64), ce qui montre également que *la réaction est bien du premier ordre.*

Les résultats obtenus sont représentés par les figures 64 et 65. Les constantes thermodynamiques relatives au processus d'activation calculées à partir des résultats représentés par les figures 64 et 65 sont les suivantes :

à pH 6,9
$\mu = 0,1$
à 75°C

$$\begin{cases} \Delta G^{\neq} = 23\,000 \text{ cal/mole,} \\ \Delta H^{\neq} = 38\,000 \text{ cal/mole,} \\ \Delta S^{\neq} = 40 \text{ cal/mole/degré.} \end{cases}$$

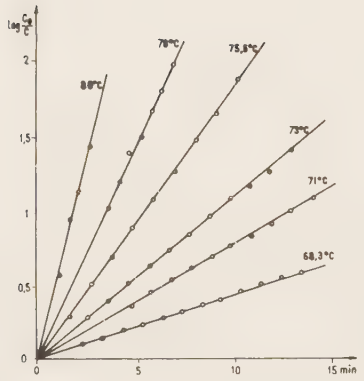


Fig. 64 - Cinétique de la réaction R → S à différentes températures dans la représentation du premier ordre.

(β-lactoglobuline B : 1,7 mg/ml, à pH 6,9, en tampon phosphate).

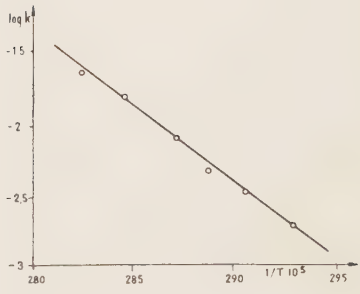


Fig. 65 - Relation entre la température T et la constante de vitesse k de la transconformation R → S.

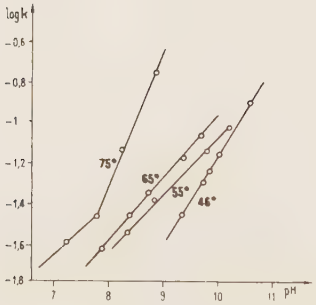


Fig. 66 - Variation de la vitesse de la transconformation R → S en fonction du pH, à différentes températures. (β-lactoglobuline A : 0,95. 10⁴M soit 1,7 mg/ml.

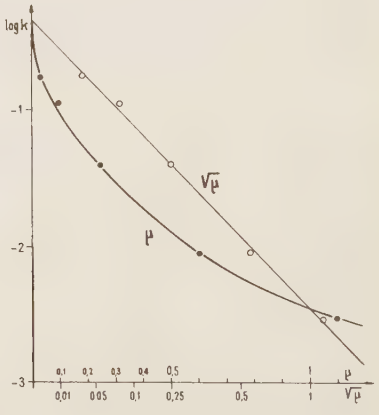


Fig. 67 - Variation de la constante de vitesse de la transconformation R → S en fonction de la force ionique.

(β-lactoglobuline : 0,9 mg/ml, pH 7,3, tampon phosphate $\mu = 0,1$, à 75,5° C).

La variation de force ionique est obtenue soit par dilution du tampon, soit par addition de NaCl.

3.- EFFET DU PH

La cinétique de la réaction R → S a été étudiée en fonction du pH pour différentes valeurs de la température : 75°, 65°, 55° et 46°C, la concentration protéique était de 1,7 mg/ml, $\mu = 0,1$.

Les résultats obtenus (fig. 66) montrent que la vitesse de cette réaction dépend fortement de la valeur du pH de la solution ; à une température donnée la constante de vitesse, k, est d'autant plus grande que la valeur du pH est plus élevée. Nous pouvons également dire, que, pour une constante de vitesse donnée, $k = 0,28\ min^{-1}$ par exemple, on obtient des réactions isocinétiques pour les couples de valeurs température - pH suivantes :

T (°C)	75°	65°	55°	46°	25°
pH	8	9	9,25	9,75	(10,26[a])

((a) valeur obtenue par Bunville par polarimétrie).

Ces données nous montrent que le facteur température et le facteur pH ne sont pas des variables indépendantes et la distinction entre dénaturation thermique et dénaturation alcaline semble précaire. En effet quelque soit le pH et la température auxquels s'effectue la réaction, la cinétique est toujours du premier ordre et le produit final de la réaction observé dans des mêmes conditions de température et de pH (par exemple pH 8,3 et à 20°C) est identique dans tous les cas.

4.- EFFET DE LA FORCE IONIQUE

Nous avons étudié la cinétique de la transconformation R → S de la β-lactoglobuline à différentes forces ioniques de $\mu = 0,03$ à $\mu = 1,1$, dans les conditions suivantes : concentration protéique C = 0,9 mg/ml, température 75,5°C, et pH 7,3 en tampon phosphate. On fait varier la force ionique de la solution par addition de NaCl 4M. La concentration protéique utilisée est relativement faible, afin d'éviter l'aggrégation de la β-lactoglobuline S, aux valeurs élevées de la force ionique.

Les principaux résultats obtenus sont représentés par la figure 67, où l'on voit que l'augmentation de la force ionique de la solution réduit de façon considérable la vitesse de la transconformation R → S ; à la force ionique $\mu = 1,1$, la vitesse de cette réaction est 50 fois plus faible que pour $\mu = 0,03$.

Dans le cas de réactions faisant intervenir des ions, l'équation de Bronsted relie la constante de vitesse de la réaction à la force ionique de la solution :

$$\log k = \log \frac{kT}{h} \cdot K^{\neq} + a\, z_A \cdot z_B \sqrt{\mu}$$

(Le coefficient a est égal à 1,018 en solution aqueuse à 20°C, et à 1,14 pour 76°C, k est la constante de Bolzman, h la constante de Plank, T la température absolue et $K^{\neq}$ la constante d'équilibre de formation du complexe activé).

Cette relation permet de prévoir que la courbe exprimant log K en fonction de la racine carrée de la force ionique μ, doit être une droite dont la pente est voisine de $z_A \cdot z_B$, produit des charges des ions intervenant dans la réaction.

La variation de log k en fonction de $\mu^{1/2}$, comme le montre la figure 67, nous donne une droite de pente -2. Nous pouvons donc dire qu'il s'agit là d'un *effet cinétique primaire de sel* qui traduit l'existence d'interactions électrostatiques. Le fait que la pente de la droite soit négative et égale à -2., indique que la réaction est favorisée soit par l'attraction de charges de signes opposés, le produit des charges étant égal à -2, soit au contraire par la répulsion de charges de mêmes signes, le produit des charges serait alors positif mais le coefficient *a* serait négatif. La première de ces hypothèses est à rejeter, car au point isoélectrique où le phénomène d'attraction entre charges de signes contraires est le plus grand, la réaction R → S ne se produit pas. Au contraire la seconde hypothèse semble confirmée par le fait que la réaction R → S est favorisée par une élévation de pH, c'est-à-dire par une diminution des charges positives par rapport aux charges négatives. Nous pouvons donc dire que l'augmentation de la force ionique, inhibe la réaction R → S, en diminuant les répulsions électrostatiques.

5.- EFFET DU FERRICYANURE DE POTASSIUM

Nous avons vu, page 122, que le ferricyanure de potassium, en absence d'ion cuivre, est sans effet sur la β-lactoglobuline native ou réversiblement transformée à 20°C ; en élevant la température la solution de l'oxydation de la β-lactoglobuline devient possible :

Expérience : Nous avons mis en présence 4,4 mg/ml (soit $2{,}44\ 10^{-4}$M) de β-lactoglobuline B et 10^{-3}M de ferricyanure de potassium, en tampon phosphate $\mu = 0{,}1$ pH 7,03.

- à 20°C, la densité optique du ferricyanure de potassium à 420 mμ ne varie pas.

- à 75,5°C, comme le montre la figure 68, il se produit, après un temps de latence plus long que le temps de chauffage, une diminution de densité optique du ferricyanure de potassium suivant une cinétique de réaction d'ordre 1 ($k = 0{,}3\ \text{min}^{-1}$ à 75,5°C). La concentration du ferricyanure réduit est de $2{,}2\ 10^{-4}$M en fin de réaction, ce qui correspond à l'oxydation, par le ferricyanure de potassium, de 0,9 groupe SH par molécule de β-lactoglobuline. Un dixième des groupes SH non titrés a pu subir une auto-oxydation spontanée.

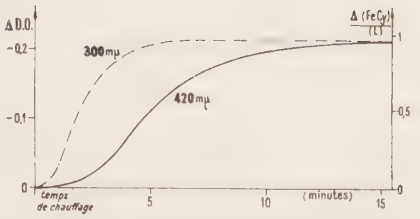
- sur la figure 68 nous avons également représenté la cinétique de la transition R → S suivie à 300 mμ, dans les mêmes conditions que l'expérience précédente mais en absence de ferricyanure. Le temps de latence correspond ici, au temps de chauffage de la solution.

La réaction d'oxydation de la β-lactoglobuline par le ferricyanure de potassium est une réaction plus lente que la transition R → S, et le temps de latence observé semble prouver que la réaction R → S est une étape nécessaire dans le processus d'oxydation de la β-lactoglobuline, au cours de laquelle le groupe SH masqué serait rendu accessible.

Il apparaît donc dans cette expérience, une fois de plus, que le groupe SH de la β-lactoglobuline joue un rôle de premier plan dans le mécanisme de la transition R → S et partant dans le maintien de la structure native de la protéine.

Fig. 68 - *420 mμ* - Cinétique de la réduction du ferricyanure par la β-lactoglobuline A, C = 4,4 mg/ml, *à 76°C*, à pH 6,93 en tampon phosphate μ = 0,1, en absence de Cu^{++}.

300 mμ - Cinétique de la transconformation R → S dans les mêmes conditions, en absence de ferricyanure.



A 20°C, aucune de ces deux réactions ne se produit. Le temps de latence observé dans l'oxydation de la β-lactoglobuline par le ferricyanure semble correspondre à la transition R → S. La β-lactoglobuline de forme N ou R n'est pas oxydable par le ferricyanure, la transconformation R → S doit donc être une réaction préalable et nécessaire pour permettre l'oxydation d'un groupe par molécule de β-lactoglobuline.

Le démasquage des groupes SH de la β-lactoglobuline au cours de la dénaturation thermique a été utilisé par Larson et Jenness (1951), pour suivre la cinétique de dénaturation de la protéine. Ces auteurs, qui employèrent le titrage à l'o-iodobenzoate, ont montré que la cinétique de dénaturation thermique de la β-lactoglobuline est une réaction d'ordre 1 qui a une énergie d'activation d'environ 80 000 cal/mole entre 64 et 75°C.

Malheureusement il est difficile de comparer nos résultats, obtenus à partir de l'observation directe de l'évolution du spectre de la β-lactoglobuline au cours de la réaction à ceux obtenus par Larson *et al* à l'aide d'une technique indirecte où les groupes SH oxydables apparus sont titrés 48 heures après l'expérience.

III.- AGREGATION THERMIQUE DE LA β-LACTOGLOBULINE

L'agrégation thermique des protéines globulaires est un fait d'observation courante et la β-lactoglobuline n'échappe pas à la règle. Cependant, comme nous allons le voir, ce phénomène banal est le terme d'une série de réactions successives, complexes et mal connues, où les groupes SH, les charges électriques et les groupements apolaires de la protéine jouent un rôle important.

A.- ETUDE CINETIQUE DE L'AGREGATION THERMIQUE

Une solution de β-lactoglobuline de 8,65 mg/ml en tampon phosphate pH 6,9 μ = 0,1, chauffée 24 minutes à 80°C, apparaît légèrement opalescente à l'oeil si l'on éclaire la solution perpendiculairement à la direction d'observation ; par transparence et sous 1 cm d'épaisseur la solution paraît limpide ; sous forte épaisseur, 10 cm, cette solution apparaît nettement jaune. Les spectres d'absorption de cette solution de β-lactoglobuline chauffée pendant 6, 12 et 24 minutes à 80°C, sont représentés sur la figure 69. Cette absorption qui s'étale sur une très large zone spectrale en dehors de la région d'absorption des chromophores de la protéine est imputable au phénomène de diffusion de la lumière par des agrégats qui se sont formés au cours du chauffage.

La décroissance de l'intensité du faisceau lumineux I avec l'épaisseur, l, de solution traversée est : $dI/dl = -\tau I$.

La turbidité τ est une constante analogue au coefficient d'extinction moléculaire en spectrophotométrie d'absorption. Par intégration de l'équation précédente on obtient :

$$\text{Log } I_o/I = \tau l$$

Dans nos expériences $l = 1$ cm, la valeur de la turbidité nous est donc donnée directement par la mesure de la densité optique de la solution en dehors des bandes d'absorption vraie de la protéine.

Lorsque les molécules dissoutes ont des dimensions moyennes ne dépassant pas 1/20 de la longueur d'onde c'est-à-dire 150 Å, la théorie de Debye donne la relation suivante :

$$\tau = \frac{32\pi^3 n_o^2 (dn/dc)^2}{3 N \lambda_o^4} \cdot M c$$

$$\tau = H M c$$

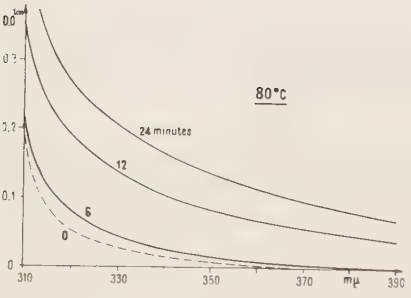


Fig. 69.

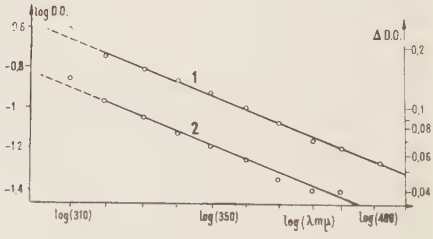


Fig. 70.

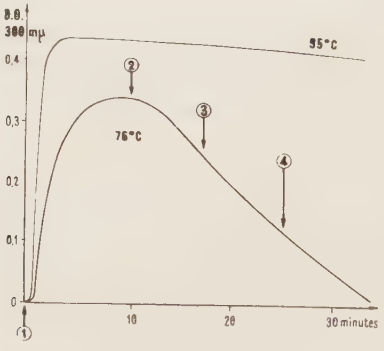


Fig. 71 - a - Variation de la densité optique à 300 mμ de la β-lactoglobuline A, à 76° C, C = 7,7 mg/ml, pH 6,9 en tampon phosphate $\mu = 0,1$.

b - Même expérience à 95° C.
En 1-2-3-4... la réaction est interrompue par refroidissement et la solution soumise à l'ultracentrifugation analytique - voir fig. 72.

c, concentration de la solution (en g par ml)
n_o, indice de réfraction du solvant
n, indice de réfraction de la solution
λ, longueur d'onde de la lumière dans le vide
N, nombre d'Avogrado
M, la masse molaire moyenne en poids du corps dissous.

Pour prouver que l'absorption que nous observons (fig. 69) est bien due au phénomène de diffusion de la lumière par des agrégats, nous avons porté (fig. 70) $\log \tau$ en fonction de $\log \lambda$, λ variant entre 400 et 310 mμ, et nous avons obtenu effectivement une relation linéaire, comme le laisse prévoir l'équation ci-dessus. La variation de τ à une longueur d'onde donnée en fonction du temps de chauffage doit nous permettre de suivre de façon continue la cinétique d'agrégation de la β-lactoglobuline. Le processus d'agrégation est arrêté par refroidissement brusque et il est alors possible, au moyen de l'ultra-centrifugation analytique, d'étudier la composition moléculaire de la solution protéique et de contrôler ainsi les résultats obtenus par turbidimètrie.

Nous avons réalisé l'expérience suivante: une solution de β-lactoglobuline, C = 7,7 mg/ml en tampon phosphate, pH 6,9, μ = 0,1, est portée rapidement à 76°C et nous enregistrons, en fonction du temps, la variation de densité optique à 300 mμ (fig. 71).

La variation de densité optique à 300 mμ décrit une courbe complexe où l'on distingue deux parties principales :

- tout d'abord, une diminution de densité optique qui correspond nous l'avons vu, page 135, à une modification du spectre d'absorption de la β-lactoglobuline concomitante de la transconformation irréversible R → S qui se produit sous l'action de la chaleur.

- ensuite une augmentation de densité optique suit la transition R → S et correspond à un accroissement de la turbidité de la solution et donc à un accroissement de la masse moléculaire moyenne de la β-lactoglobuline.

Cette expérience a été reproduite plusieurs fois dans les mêmes conditions et interrompue chaque fois après des temps de chauffage différents en abaissant rapidement la température de la solution. Chacune de ces solutions a été ensuite soumise à l'ultracentrifugation analytique (59 780 t/min. à 20° C).

Les clichés pris au cours de la sédimentation, montrent qu'après 10 minutes de chauffage il se forme un système à deux constituants (fig. 72) : un constituant lent, qui possède une constante de sédimentation 2,9 S, très proche de celle de la β-lactoglobuline native, 2,8 S, et un constituant rapide formé d'une population d'agrégats dont la polydispersité n'est pas très large et dont le coefficient de sédimentation moyen est de 27 S.

Nous avons calculé la concentration respective de ces deux constituants après les différents temps de chauffage, à partir de mesures planimétriques, faites sur des clichés agrandis dix fois, de l'aire comprise sous chacun des pics de sédimentation. Les résultats sont représentés dans le tableau X.

TABLEAU X

Cinétique d'agrégation thermique de la β-lactoglobuline suivie par ultra-centrifugation analytique à 20°C.

Concentration protéique totale : C_t = 7,7 mg/ml en tampon phosphate μ = 0,1, pH 6,9 à 76°C.

Temps de chauffage en minutes t	Coef. de sédimentation s_1	Conc. du constituant lent C_1	Coef. de sédimentation s_2	Conc. du constituant rapide C_2	C_1/C_t	$(C_t/C_1)^{-1}$
0	2,8	7,7	-	0	1	0
10	2,8	7,3	-	0,45	0,95	0,05
17	2,9	6	27,3	1,8	0,78	0,3
25	2,8	3,2	27,5	4,5	0,41	1,4
35	2,9	2,2	27,6	5,5	0,29	2,5
140	2,9	0,5	30	7,7	0,06	15,3

Il est bon de remarquer que la constante de sédimentation moyenne des agrégats ne varie presque pas au cours du temps de chauffage, seule augmente la concentration de ces agrégats. La variation de turbidité, τ, enregistrée au cours du temps de chauffage peut donc être considérée comme étant due essentiellement à une augmentation de la concentration C_2, des agrégats de masse moléculaire moyenne constante : donc $\tau = H M C_2$.

Le fait que l'on puisse, avec une bonne approximation, considérer que τ ne dépend que de la valeur de C_2, simplifie beaucoup l'étude cinétique de l'agrégation de la β-lactoglobuline par turbidimétrie.

La cinétique d'agrégation de la β-lactoglobuline, obtenue par turbidimétrie et par ultra-centrifugation analytique est représentée figure 73 : les deux méthodes donnent des résultats identiques, cependant la turbidimétrie est une méthode directe et d'utilisation plus aisée, c'est pourquoi nous l'utiliserons de préférence à la sédimentation dans la suite de cette étude. Les deux techniques utilisées mettent en évidence, au début de la réaction d'agrégation, un temps de latence nettement plus long que le temps nécessaire à la montée de température, ce qui prouve que la β-lactoglobuline native de forme N ou R à hautes températures n'est pas capable de former des agrégats. La transconformation irréversible de la forme R en la forme S, qui se produit en quelques minutes pour des températures supérieures à 70°C, semble être une étape indispensable dans le processus d'agrégation de la β-lactoglobuline. Après cette phase de latence, l'agrégation de la β-lactoglobuline est une réaction du 2ème ordre, comme le montre le fait que la représentation, $(C_t/C_1)-1$ en fonction du temps soit une droite. Puisque l'on ne trouve pas de produit intermédiaire d'agrégation entre le constituant de constante de sédimentation 2,9 S, correspondant à un dimère de β-lactoglobuline de forme S que nous appellerons S_2, et les polymères S_n, on peut penser que la réaction d'ordre 2 observée est une tétramérisation lente suivie par une série d'associations rapides aboutissant à la formation d'un polymère dont la masse moléculaire la plus stable correspondrait à un coefficient de sédimentation voisin de 27 s. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

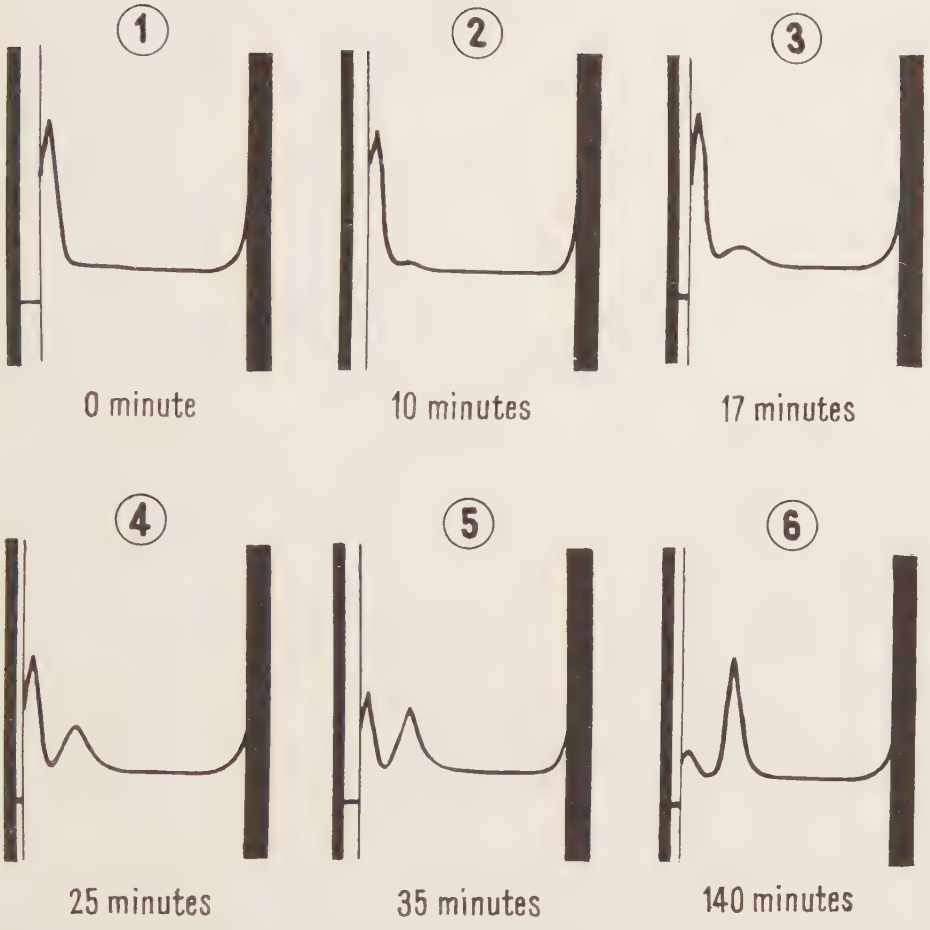


Fig. 72 - Clichés obtenus après 6 minutes d'ultracentrifugation de la β-lactoglobuline à 20° C, à 59.780 t/ min., après différents temps de chauffage de la solution à 76° C. (voir figure 71).

Nous avons étudié à différentes concentrations protéiques et à différentes températures la vitesse d'agrégation de la β-lactoglobuline. Nos résultats ont montré que cette vitesse est proportionnelle au carré de la concentration protéique de la solution dans la zone de température comprise entre 70 et 95° C, ce qui confirme que la réaction d'agrégation est limitée par un processus bimoléculaire.

B.- ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LA CINETIQUE D'AGREGATION DE LA β-LACTOGLOBULINE

Nous avons enregistré en fonction du temps, la variation de densité optique à 300 mμ de la β-lactoglobuline (C = 8,65 mg/ ml, tampon phosphate, μ = 0,1 et pH 6,9) à différentes températures comprises entre 65 et 95° C. Le choix de la longueur d'onde utilisée, 300 mμ, nous permet à la fois, de suivre l'agrégation thermique de la β-lactoglobuline et la transconformation irréversible R → S qui la précède.

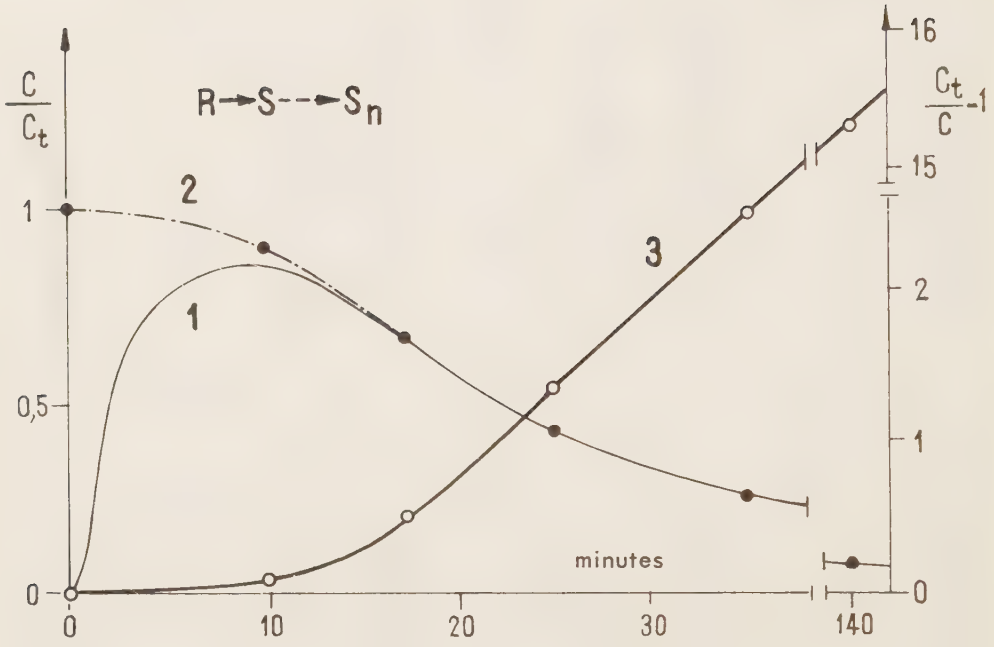


Fig. 73 - Représentation graphique de C_1/C_t et $(C_t/C_1) - 1$ en fonction du temps.
1.- Données de spectrophotométrie
2.- Données d'ultracentrifugation analytique
3.- Représentation en $(C_t/C) - 1$ de la courbe 2.

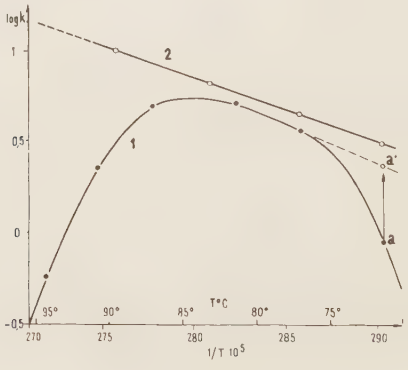


Fig. 74 - Variation de la constante de vitesse d'agrégation, k, de la β-lactoglobuline en fonction de la température.

1 - A partir de la β-lactoglobuline native,

2 - A partir de la β-lactoglobuline préchauffée 10 minutes à 95°C et refroidie ensuite à 20°C.

Les valeurs des constantes de vitesse d'agrégation, k, obtenues à différentes températures, sont portées sur la courbe 1 de la figure 74, où nous avons représenté la variation de log k en fonction de 1/T.

Nous remarquerons que dans l'intervalle étroit de température, de 65 à 95°C, la réaction d'agrégation n'obéit pas en apparence à l'équation d'Arrhénius :

$$\text{Log } k = -\frac{E_a}{RT} + \text{Log } A$$

où E_a est *l'énergie d'activation expérimentale* de la réaction : $E_a = \Delta H^\circ + RT$

A est une constante.

Le fait que la variation de log k en fonction de 1/T ne soit pas une droite peut être dû, soit à ce que l'énergie d'activation E_a est elle-même fonction de la température, soit plus vraisemblablement à ce que nous avons affaire à une suite de réactions de nature très différente.

En effet au-dessous de 76°C, la réaction d'agrégation de la β-lactoglobuline est nettement limitée par la vitesse de la transition $R \rightarrow S$ et la valeur mesurée *a* de log K est très inférieure à la valeur réelle *a'* obtenue après correction.

Nous avons ainsi, entre 71 et 81°C, une droite de pente négative pour la variation de log k en fonction de 1/T ; la réaction d'agrégation thermique de la β-lactoglobuline est donc, comme on pouvait s'y attendre *une réaction andothermique.*

Cependant au-dessus de 81°C, nous observons, comme Briggs et Hull (1945), une diminution importante de la vitesse d'agrégation de la protéine qui va jusqu'à l'inhibition quasi totale de la réaction aux environs de 100°C. Cela se traduit sur la figure 74, par une inversion de la pente de la droite, représentant log k en fonction de 1/T, qui devient positive : *une réaction fortement exothermique semble donc limiter la vitesse d'agrégation de la β-lactoglobuline à haute température.*

Une solution de β-lactoglobuline portée quelques minutes à haute température, voire à l'ébullition, est cependant capable de former des agrégats lorsque l'on réduit la température de la solution, mais alors le mécanisme d'agrégation est, comme nous allons le voir, assez différent.

Nous avons repris l'étude de la variation de la vitesse d'agrégation de la β-lactoglobuline en fonction de la température, avec une solution identique à la précédente mais qui a été préchauffée 10 minutes à 94°C et refroidie rapidement à 20°C. Les résultats obtenus sont à tout fait différents des précédents, comme le montre la courbe 2 de la figure 74 : la variation de log k en fonction de 1/T est parfaitement linéaire, car d'une part, la réaction d'agrégation n'est plus limitée aux basses températures par la vitesse de la réaction $R \rightarrow S$, puisque celle-ci a eu lieu au cours du préchauffage et d'autre part, l'agrégation n'est plus limitée aux températures élevées par la réaction exothermique, qui a dû se produire inévitablement au cours du refroidissement à 20°C.

Après la transition $R \rightarrow S$, nous pouvons donc distinguer dans la voie de l'agrégation thermique de la β-lactoglobuline, une étape exothermique et une étape endothermique :

Etape exothermique : l'existence de cette étape qui se situe entre la transition $R \rightarrow S$ et la dimérisation $S_2 \rightarrow S_4$, vient combler la lacune qui existait entre ces deux réactions. En effet, nous avons montré plus haut que la transition thermique irréversible $R \rightarrow S$ était une réaction monomoléculaire, or nous n'observions par ultracentrifugation analytique à 20°C, que la présence d'un dimère S_2 de coefficient de sédimentation 2,9 S ; nous pouvons maintenant dire que cette réaction exothermique dont la vitesse est proportionnelle au carré de la concentration protéique et qui devient, aux fortes températures, la réaction limitante du processus d'agrégation est la dimérisation $2\,S \rightarrow S_2$.

Cette réaction $2\,S \rightarrow S_2$ devient limitante au-dessus de 80°C, de sorte que la cinétique d'apparition des agrégats peut être considérée comme étant le reflet de la cinétique de la réaction $2\,S \rightarrow S_2$, ce qui nous permet de calculer les constantes thermodynamiques relatives au mécanisme d'activation de cette réaction :

à 80°C
pH 6,9
$\mu = 0,1$

$\Delta G^* = 17\,000$ cal/mole.
$\Delta H^* = -91\,000$ cal/mole.
$\Delta S^* = -310$ cal/mole/degré.

Cette étape du mécanisme d'agrégation thermique de la β-lactoglobuline passe généralement inaperçue car elle ne devient limitante qu'au-dessus de 80°C, cependant Briggs et Hull (1945) ont montré clairement par électrophorèse qu'il y avait réduction de la vitesse d'agrégation de la β-lactoglobuline à haute température. Mais le protocole expérimental employé par ces auteurs ne leur a pas permis de voir que ce phénomène disparaissait après refroidissement, leurs conclusions ne sont donc pas correctes.

D'après la valeur des constantes thermodynamiques que nous avons obtenues, il semble que l'on puisse dire que cette réaction exothermique implique le démasquage de groupes apolaires, enfouis à l'intérieur de la protéine dans une région hydrophobe, c'est-à-dire en quelque sorte la " solubilisation " de groupes aliphatiques dans l'eau. Les paramètres thermodynamiques relatifs à cette solvatation sont les suivants (136) :

ΔG° = 3000 à 8000 cal/mole.
ΔH° = 0 à -3000 cal/mole.
ΔS° = - 15 à -30 cal/mole/degré.

Dans la mesure où le complexe activé, dans la réaction $2\,S \rightarrow S_2$, a une structure voisine de celle du produit final de la réaction, c'est-à-dire si $S_2^* \neq S_2$, nous voyons qu'il suffirait qu'au cours de cette réaction une partie seulement des 80 résidus hydrophobes de la β-lactoglobuline soit démasquée pour rendre compte des résultats obtenus. Cette réaction de dimérisation se ferait par formation de " liaisons hydrophobes " intermoléculaires entre une partie des groupes apolaires apparus.

Etape endothermique : le fait que cette réaction endothermique suive une réaction exothermique nous a permis, en quelque sorte, d'isoler le produit initial de cette réaction, S_2, à l'état pur ; en effet en portant pendant quelques minutes la solution de β-lactoglobuline à 95°C, nous avons favorisé la réaction $R \rightarrow S$, la réaction $2\,S \rightarrow S_2$ étant inhibée à cette température la β-lactoglobuline de forme S s'accumule rapidement ensuite par refroidissement rapide la réaction exothermique $2\,S \rightarrow S_2$ est seule favorisée et la β-lactoglobuline se transforme alors entièrement en produit S_2. Pour obtenir la réaction suivante il suffira de chauffer la solution de β-lactoglobuline ainsi traitée.

Par chauffage de cette solution on obtient une réaction d'agrégation d'ordre 2. La cinétique de cette réaction représente encore la cinétique de la réaction la plus lente de la chaîne, or par ultra-centrifugation on n'observe pas de produit intermédiaire entre le dimère S_2 et les gros polymères, c'est donc que la réaction limitante se situe avant la formation du tétramère et après la formation du dimère : ce ne peut être que la réaction $2\,S_2 \rightarrow S_4$.

La courbe 2 de la figure 74 représentant la variation de log k en fonction de 1/T est relative à cette réaction $2\,S_2 \rightarrow S_4$, les constantes thermodynamiques relatives au processus d'activation de cette réaction sont les suivantes :

à 80°C
pH 6,9
$\mu = 0,1$

$\Delta G^* = 19\,000$ cal/mole.
$\Delta H^* = 15\,000$ cal/mole.
$\Delta S^* = -13$ cal/mole/degré.

C.- ROLE DES GROUPES SH DANS L'AGREGATION

L'addition de quantité croissante de sel mercurique à des solutions de β-lactoglobuline C = 7,7 mg/ml en tampon phosphate, pH 6,9, $\mu = 0,1$ inhibe stoechiométriquement l'agrégation thermique de la protéine. *L'inhibition totale de l'agrégation est obtenue avec un ion Hg^{++} pour deux molécules de β-lactoglobuline* (PM 18 000), une concentration en ion Hg^{++} dix fois supérieure augmente au contraire la vitesse d'agrégation.

L'addition de trace d'ion Cu^{++} à la solution de β-lactoglobuline augmente considérablement la vitesse d'agrégation thermique de la protéine.

Il semble donc que le groupe SH de chaque monomère, démasqué lors de la transition $R \rightarrow S$, joue un rôle important dans cette agrégation qui pourrait se faire par formation de ponts disulfures. Il est connu en effet que cette formation de ponts S-S est catalysée par les ions cuivriques et inhibée par les ions mercuriques.

Stauff et Barthel (1961) ont proposé une théorie pour expliquer le mécanisme d'agrégation thermique des protéines globulaires possédant des ponts disulfures. Selon ces auteurs, la présence d'un groupe SH libre favoriserait la formation de ponts disulfures intermoléculaires au dépend des ponts disulfures intramoléculaires suivant le schéma :

$$(HS)\,P\,(SS) + (HS)\,P\,(SS) \rightarrow (HS)_2\,PSSP\,(SS)$$

cette réaction d'oxydo-réduction serait réversible et se produirait de proche en proche pour former des chaînes ramifiées selon les équations :

$$P_1 + P_1 \rightarrow P_2 \qquad P_2 + P_3 \rightarrow P_5$$

$$P_2 + P_1 \rightarrow P_3$$

$$P_i + P_1 \rightarrow P_{i+1} \qquad P_i + P_k \rightarrow P_{i+k}$$

La vitesse de disparition du monomère P_1 au début de la réaction d'agrégation est égale à :

$$d(P_1)/dt = k(P_1)^2$$

il tendrait ensuite à s'établir un équilibre au cours duquel la concentration du monomère P_1 et des polymères P_i serait constante. C'est cet équilibre qui explique pour ces auteurs le fait que la sérumalbumine bovine chauffée 30 mn à 60°C, à pH 7 $\mu = 0,1$, présente 2 pics sur le diagramme d'ultracentrifugation analytique, l'un de coefficient de sédimentation 4,4 s et l'autre, de coefficient de sédimentation compris entre 14 et 17 s.

Ces phénomènes sont très proches de ceux que nous avons observés avec la β-lactoglobuline, ce qui laisse penser qu'il pourrait exister un mécanisme général d'agrégation des protéines globulaires possédant des ponts disulfures et au moins un groupe SH libre.

Cette théorie permet de comprendre que la β-lactoglobuline native, N, et réversiblement transformée, R, qui ne possèdent pas de groupe SH libre, ne puissent pas s'agréger, et que la transconformation préalable R → S soit nécessaire. On comprend de même que le bloquage par un ion Hg^{++} du groupe SH démasqué puisse inhiber l'agrégation de la β-lactoglobuline de forme S.

Le mécanisme proposé par Stauff et Barthel pourrait donc se produire après la dimérisation exothermique de la β-lactoglobuline à haute température. Il nous est cependant difficile d'admettre, avec ces auteurs, la réversibilité du processus d'agrégation que nous n'avons jamais pu mettre en évidence. Il semble toutefois que cette réversibilité théorique ne puisse être envisagée que si la protéine ne s'oxyde pas au cours de l'agrégation mais échange simplement des ponts disulfures, le nombre global de groupes SH libres restant constant. Or nous allons voir que cela n'est pas le cas dans nos expériences.

Une solution de β-lactoglobuline B (4,4 mg/ml) en tampon phosphate $\mu = 0,1$, pH 7,03, est portée à 76°C. Nous pouvons à tout moment en ajoutant à la solution protéique du ferricyanure de potassium (10^{-3}M dans le milieu réactionnel) mesurer à 420 mμ la quantité de ferricyanure réduit par molécule de β-lactoglobuline, les résultats sont les suivants :

Au début de la réaction	0,9	groupes titrables par molécule de β-lactoglobuline (18 000).
Après 7 minutes	0,7	"
Après 15 minutes	0,7	"
Après 28 minutes	0,45	"

Il semble donc que le nombre de groupes SH libres diminue au cours de l'agrégation thermique de la β-lactoglobuline et par conséquent l'évolution de la réaction tend à devenir irréversible.

La réactivité des groupes SH joue certainement un rôle important dans le processus d'agrégation thermique de la β-lactoglobuline. Mais est-elle le moteur essentiel de ce mécanisme complexe ? Nous ne saurions encore l'affirmer.

D.- EFFET DE LA FORCE IONIQUE ET DU pH SUR LA VITESSE D'AGREGATION

Comme l'ont montré Briggs et Hull (1945) la vitesse d'agrégation thermique de la β-lactoglobuline est d'autant plus grande que la valeur du pH est plus près du point isoélectrique de la protéine et que la force ionique est plus élevée. Nos expériences confirment ces résultats. Cependant dans certaines conditions l'effet observé peut être tout à fait différent : par exemple, une solution de β-lactoglobuline à pH 7 à la force ionique 1 portée à 75° C ne s'agrège pas alors que la même solution forme rapidement des agrégats à la force ionique 0,1. Il semblerait dans ce cas particulier que l'abaissement de la force ionique favorise l'agrégation de la β-lactoglobuline ; en fait il n'en est rien, il s'agit là d'un effet de la force ionique sur la réaction R → S, qui comme nous l'avons vu (page 139) est inhibé par une augmentation de la force ionique de la solution ; de ce fait l'agrégation de la protéine ne peut se produire.

L'action différente du pH et de la force ionique sur la transition thermique irréversible R → S et sur la polymérisation de la β-lactoglobuline n'est pas contradictoire, on peut en proposer une explication simple : la réaction R → S est une réaction intramoléculaire favorisée par l'expansion de la molécule due aux répulsions électrostatiques entre les différents groupes chargés de la protéine, ces répulsions sont fortement accrues par une augmentation du pH et une diminution de la force ionique de la solution ; par contre ces répulsions électrostatiques s'exerçant entre molécules protéiques, diminuent la probabilité de rencontre, et partant, la vitesse de formation des agrégats se trouve diminuée.

L'action du sel a aussi un autre effet, c'est celui de désorganiser la structure de l'eau et de diminuer ainsi la solvation des chaînes hydrophobes qui ont alors tendance à s'associer entre elles, soit à l'intérieur d'une même molécule en formant une structure compacte, soit entre molécules pour former des agrégats.

Les deux effets du sel, sur les groupes chargés et sur les groupes hydrophobes, favorisent la structure compacte et la formation d'agrégats, toutefois les agrégats ne peuvent se former que s'il existe de nombreux groupes apolaires non enfouis, c'est-à-dire, seulement si la β-lactoglobuline a subi une transconformation faisant apparaître des groupes apolaires.

E.- SPECIFICITE DE L'AGREGATION THERMIQUE DES β-LACTOGLOBULINES A ET B

Timasheff *et al* ont montré à l'aide du marquage isotopique que l'association réversible monomère-dimère de la β-lactoglobuline est une réaction étroitement spécifique : des molécules de β-lactoglobuline A et de β-lactoglobuline B après avoir subi en milieu acide la dissociation moléculaire se réassocient au voisinage du point isoélectrique sans donner lieu à la formation de dimère hybride AB. Ces deux β-lactoglobulines ne diffèrent pourtant dans leur structure primaire que par deux résidus d'amino-acide.

Nous avons voulu savoir si, comme la dimérisation, l'agrégation thermique de la β-lactoglobuline était une réaction très spécifique ou si au contraire la formation de polymères hybrides entre β-lactoglobuline A et B était possible.

Pour répondre à cette question nous avons étudié dans des conditions identiques la vitesse d'agrégation de la β-lactoglobuline A, de la β-lactoglobuline B et la vitesse d'agrégation du mélange équimoléculaire des β-lactoglobulines A et B.

Dans les conditions expérimentales suivantes : concentration protéique C = 10,5 mg./ml, tampon phosphate pH 7 $\mu = 0,1$ et à 76°C.

Nous obtenons les résultats ci-dessous :

β-lactoglobulines	constantes de vitesse d'agrégation
A	4 litre . mole^{-1} . minute^{-1}
B	3,2 "
A + B	3,5 "

Les vitesses d'agrégation des β-lactoglobulines A et B peuvent s'écrire :

$$V = k_A (A)^2 \qquad \text{et} \qquad V = k_B (B)^2$$

La vitesse d'agrégation du mélange A B où la formation des agrégats se ferait au hasard entre molécule A et B, serait :

$$V = 1/2 (k_A + k_B) \cdot ((A) + (B))^2$$

Dans le cas intermédiaire où se formerait une certaine proportion d'hybrides, on doit pouvoir écrire l'équation générale :

$$V = k_A(A)^2 + k_B(B)^2 + k_{AB}(A)(B) + k_{BA}(B)(A)$$

k_{AB} et k_{BA} sont les constantes d'agrégation entre β-lactoglobulines A et B ; puisqu'il y a formation de polymères, il existe au moins deux aires de contact par molécule et dans ce cas l'hybridation AB peut être très différente de l'hybridation BA comme le montre le schéma ci-dessous :

Si nous appelons (P) la concentration protéique totale de la solution, dans le mélange équimoléculaire, nous aurons (A) = (P)/2 et (B) = (P)/2.

1.- Si l'agrégation est très spécifique

$$V = (k_A + k_B)((P)/2)^2 \qquad \text{soit} \qquad V = \frac{k_A + k_B}{4} (P)^2$$

2.- Si l'agrégation n'est pas spécifique

$$V = \frac{k_A + k_B}{2} (P)^2$$

Nous remarquerons que dans ce dernier cas la constante apparente de vitesse d'agrégation est égale à la valeur moyenne des constantes d'agrégation k_A et k_B alors que dans le premier cas la constante apparente de vitesse est égale à la moitié de cette valeur.

Puisque nous avons trouvé que $k_A = 4$ et $k_B = 3,2$ nous devons obtenir pour les constantes apparentes, k, les valeurs suivantes :

dans le 1er cas k = 1,8 et dans le 2ème cas k = 3,6.

L'expérience nous donne k = 3,5, nous pouvons donc affirmer que *l'agrégation des β-lactoglobulines A et B n'est pas spécifique, ces protéines s'agrègent au hasard pour former des agrégats hybrides.*

IV.- CONCLUSION

La transconformation réversible $N_2 \rightleftharpoons 2R$ rend accessible le groupe SH de la β-lactoglobuline aux réactifs spécifiques des thiols (Hg^{++}, Ag^{+}, Cu^{++}, PCMB...). La fixation d'un de ces ions sur le groupe SH, provoque dans tous les cas la même modification de la structure de la β-lactoglobuline. Cette transconformation peut également être obtenue par augmentation du pH ou par élévation de la température de la solution protéique.

Cette molécule de β-lactoglobuline modifiée est nettement caractérisée par ses propriétés rotatoires, son spectre de différence, sa courbe de titrage, son diagramme d'élution chromatographique, etc...

Ce changement de configuration qui fait intervenir un groupe SH par molécule de lactoglobuline (18 000) et que nous appelons transition $R \rightarrow S$, est une réaction irréversible qui entraîne l'irréversibilité de la première modification de structure liée à l'ionisation du carboxyle anormal.

Nous pouvons donc écrire :

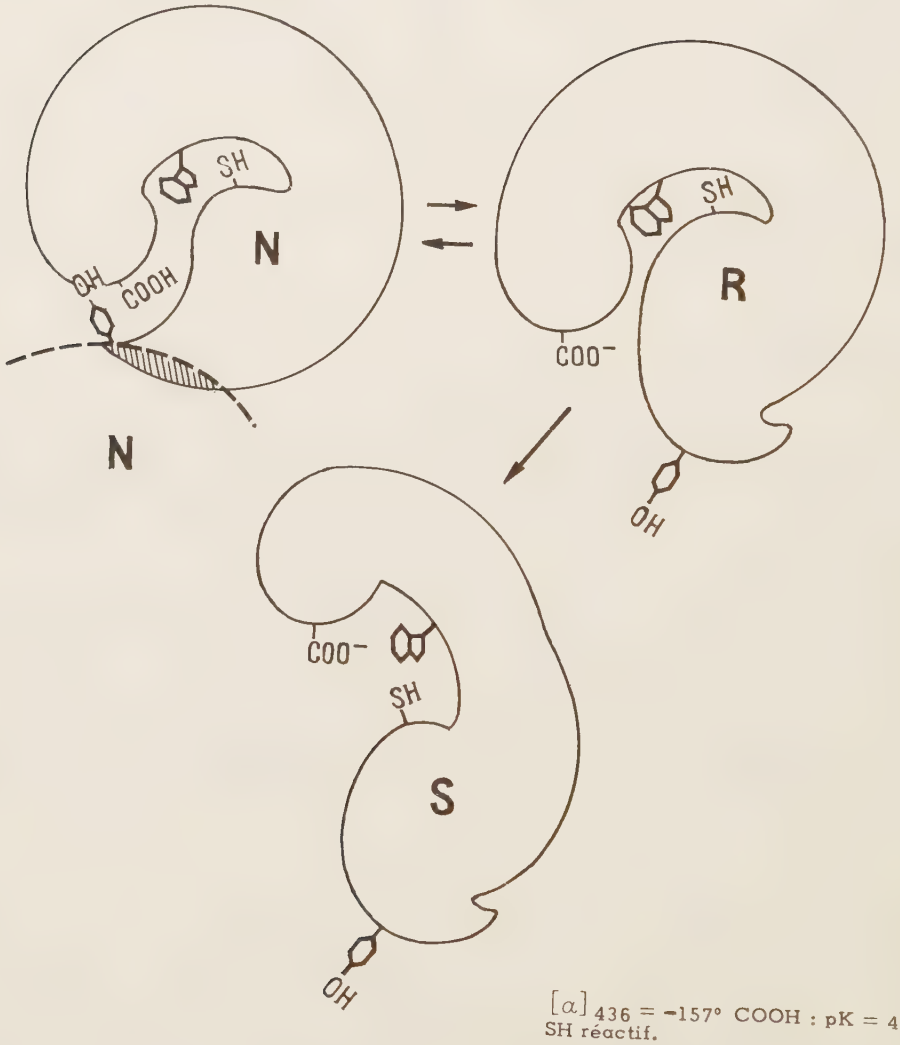
$$N_2 \rightleftharpoons 2\,R$$

$$R \rightarrow S \qquad \text{(voir figure 75).}$$

La structure native de la β-lactoglobuline tend à se transformer de façon irréversible, elle ne semble donc pas thermodynamiquement stable ; cependant en abaissant la température, en amenant la valeur du pH au voisinage du point isoélectrique et en augmentant la force ionique, on accroît considérablement l'enthalpie libre d'activation de la réaction irréversible : la protéine est alors cinétiquement stable (quoique toujours instable du point de vue thermodynamique). (C'est sans doute une des raisons pour laquelle on peut conserver, sans trop de perte, pendant des mois la β-lactoglobuline native en solution à pH 5,2, en présence de sulfate d'ammonium à 50 % de saturation et à 4°C).

$[\alpha]_{436} = -64°$, COOH : pK = 7,75
SH non réactif.

$[\alpha]_{436} = -105°$, COOH : pK = 4,6
SH peu réactif, 1 tyr. démasquée (fig. 76).



$[\alpha]_{436} = -157°$ COOH : pK = 4,6
SH réactif.

1 tyr. et 1 tryp. démasquées (fig. 77 et 78).

Fig. 75 - Modèle proposé pour rendre compte des phénomènes observés lors des réactions consécutives : $N_2 \rightleftharpoons 2\,R \qquad R \rightarrow S$.

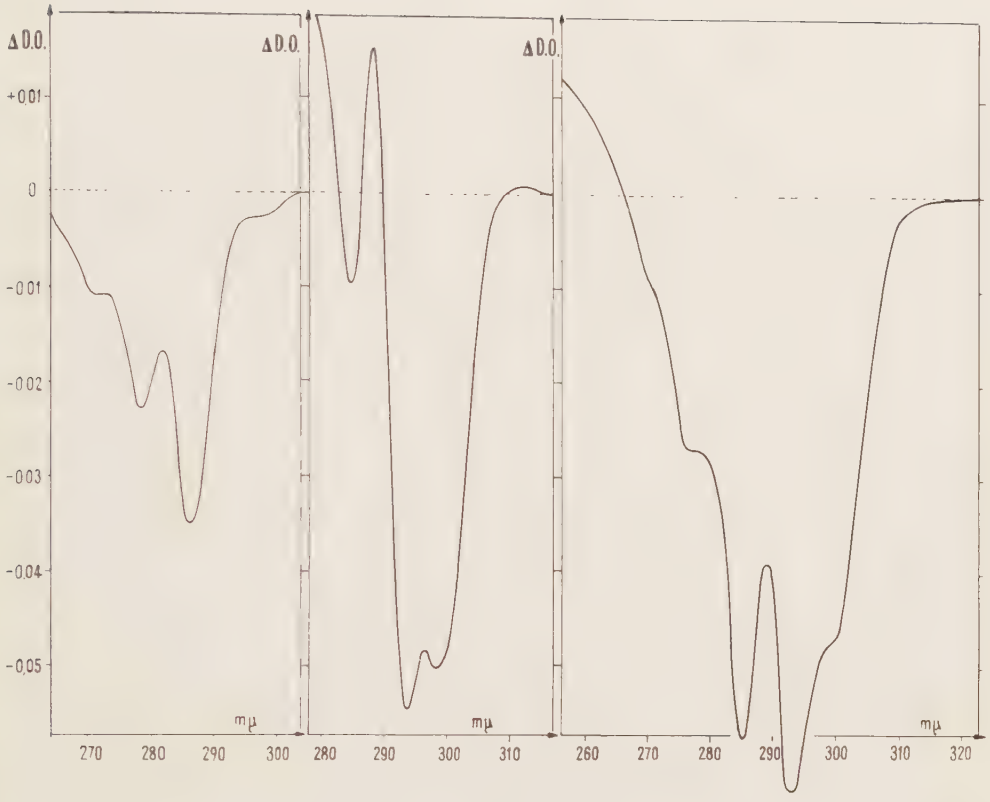


Fig. 76 - Spectre de différence de la β-lactoglobuline R par rapport à la β-lactoglobuline N. (C = 1,43 mg/ml). Démasquage réversible de la tyrosine (voir page 71).

Fig. 77 - Spectre de différence de la β-lactoglobuline S par rapport à la β-lactoglobuline R. (C = 1,43 mg/ml). Démasquage irréversible d'un résidu tryptophane (voir pages 129 et 130).

Fig. 78 - Spectre de différence de la β-lactoglobuline S par rapport à la β-lactoglobuline N. Les deux solutions à pH 6,2 et C = 1,65 mg/ml.

Si la conformation native n'est pas la plus probable, nous sommes obligés d'admettre qu'au moment de la synthèse protéique la molécule a reçu une énergie supplémentaire pour lui imprimer la structure native, ou encore que les conditions physicochimiques au moment de la synthèse étaient telles que la structure native était alors la plus probable.

Par chauffage la transition $N_2 \rightleftharpoons 2R$ est déplacée vers la droite, la forme R se modifie irréversiblement pour donner la forme S suivant une réaction d'ordre 1. La β-lactoglobuline S se dimérise, la réaction est fortement exothermique mais peut se faire grâce à une diminution considérable de l'entropie du système. Le bilan de cette réaction semble correspondre à une solvatation de groupes hydrophobes de la protéine. La lactoglobuline dimère S_2 qui possède un groupe SH libre par protomère va ensuite donner naissance à des agrégats dont la masse moléculaire moyenne la plus stable correspond à un coefficient de sédimentation de 27 S. Le groupe SH libre joue un rôle déterminant dans cette agrégation, le blocage de ce groupe par les ions Hg^{++} inhibe totalement la réaction, d'autre part, le nombre de thiols libres diminue au cours de l'agrégation thermique de la β-lactoglobuline.

Nous résumerons ci-dessous la série de réactions que nous avons mise en évidence entre l'état natif, N, et l'état agrégé de la β-lactoglobuline et se produisant au cours du chauffage.

	$N_2 \rightleftharpoons 2R$	NaCl → $2S$	Hautes températures → S_2	Hg^{++} → $S_4 \longrightarrow S_n$
Agents inhibiteurs				
Nature des groupes impliqués	COOH tyrosine	SH tryptophane	nbx. groupes hydrophobes	SH
	équilibres rapides	Ordre 1	Ordre 2	Ordre 2
à 80°C ΔG^*	(cf. chap IV)	23000	17000	19000 cal/mole
pH 6,9 ΔH^*		38000	-91000	15000 cal/mole
μ 0,1 ΔS^*		42	- 310	-13 cal/mole/d°

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de ce travail nous avons successivement envisagé la structure de la β-lactoglobuline en solution aqueuse à son point isoélectrique et les changements de structures réversibles et irréversibles que peut subir cette protéine lorsque l'on modifie les conditions de milieu au-dessus du point isoélectrique.

La β-lactoglobuline nous le savons, est au voisinage de son point isoélectrique une macromolécule compacte de masse moléculaire relativement faible (18 000) associée par paire pour former un dimère. Nous avons montré que les propriétés rotatoires optiques de cette protéine ne pouvaient pas s'expliquer par la seule présence, dans la molécule, de structure en hélice α et de structure en pelote statistique ; ceci semble également vrai pour un grand nombre de protéines globulaires. Nous pouvons rendre compte de la dispersion rotatoire de la β-lactoglobuline en admettant la présence de structure β, nous obtenons alors, en utilisant les formules établies au chapitre III : 15 % de structure en hélice α, 25 % de structure β et 60 % de la chaine peptidique repliée de façon apériodique. Il est aussi très vraisemblable qu'une contribution importante au pouvoir rotatoire est due à la présence d'ilôts hydrophobes à l'intérieur de la protéine.

Les résultats obtenus par spectrophotométrie montrent que les groupes aromatiques de la β-lactoglobuline ne sont pas accessibles au solvant et que leur spectre d'absorption présente un déplacement de 50 A vers les grandes longueurs d'ondes dans la protéine native par rapport à la protéine hydrolysée. Ces faits semblent indiquer que les groupes aromatiques seraient enfouis au sein de la protéine avec d'autres résidus à chaîne aliphatique pour former des régions peu polaires et de basses constantes diélectriques d'où le solvant aqueux serait exclu. Le parallélisme observé entre les variations de densité optique et les variations de pouvoir rotatoire montre que cet environnement hydrophobe, par son caractère apolaire et son indice de réfraction élevé, affecte l'énergie de transition électronique des chromophores aromatiques et de la même manière, certainement, les transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ des groupes responsables des propriétés rotatoires de la protéine. Ceci se traduit lors de la dissociation de ces régions hydrophobes par une modification du spectre d'absorption (" blue shift "), et par une augmentation de la lévorotation de la protéine.

Les groupes polaires seraient tous au contact du solvant libre sauf un groupe COOH et un groupe SH qui seraient enfouis dans deux régions hydrophobes différentes, le premier au voisinage d'un résidu tyrosine et le second au voisinage d'un

résidu tryptophane. Le démasquage de la région hydrophobe contenant le groupe SH et le noyau indol est subordonné au démasquage préalable de la région hydrophobe contenant le groupe COOH et le résidu tyrosine. Le démasquage de ces deux régions se fait par réactions consécutives.

Cette image de la β-lactoglobuline que nous proposons rend compte de nos résultats expérimentaux et permet de comprendre :

1.- que cette protéine, qui contient cependant un grand nombre de groupes apolaires, soit très soluble dans l'eau en présence de sels,

2.- que la valeur de la constante d'ionisation du groupe COOH anormal, du groupe SH et des groupes phénols soit anormalement basse dans la protéine non dénaturée (mille fois trop faible dans le cas du COOH anormal),

3.- que, du fait de leur ionisation, le groupe COOH et le groupe SH devenant très fortement polaires puissent faire "éclater" la région hydrophobe dans laquelle ils se trouvent en entraînant un réarrangement de la structure de la protéine.

Le changement de structure tertiaire associé à l'ionisation du groupe carboxylique entre pH 6 et 9 est parfaitement réversible. Cette transconformation modifie de façon importante l'équilibre de dimérisation de la β-lactoglobuline; il semble donc qu'elle intéresse une région de la protéine proche de l'aire de contact par laquelle se fait spécifiquement l'association des protomères.

Nous avons mis en évidence que l'ionisation du carboxyle anormal, la transconformation et la dimérisation de la β-lactoglobuline ne sont pas indépendantes. Ces phénomènes liés qui constituent ce que nous appelons la transition $N_2 \rightleftarrows 2R$ de la β-lactoglobuline, ont été l'objet d'une étude théorique qui nous a permis d'établir de façon générale les relations exactes existant entre les phénomènes de transconformation, de dimérisation et de fixation spécifique d'un ligand ou d'un proton quand on fait varier l'activité du ligand ou du proton dans la solution.

Les résultats obtenus, appliqués à la β-lactoglobuline nous ont donné la possibilité d'évaluer les constantes "intrinsèques" d'équilibre de dimérisation, de transconformation et d'ionisation du carboxyle anormal dans les 8 formes de β-lactoglobuline en équilibre.

Ces résultats peuvent être appliqués dans tous les cas où la fixation d'un ligand sur une molécule induit un changement dans la structure moléculaire ou dans l'état d'association de ces molécules entre elles ou encore dans les deux à la fois. Nous pensons en particulier au changement de structure, induit dans les protéines enzymatiques par la fixation spécifique d'un substrat, d'un coenzyme, d'un ion métallique ou d'un effecteur allostérique.

La fixation d'un ion cuivrique par la molécule de β-lactoglobuline, au voisinage de pH 6, est associé très spécifiquement à un changement réversible de la structure de la protéine. Cette nouvelle structure est telle que les deux imidazoles de la molécule se trouvent alors assez proches l'un de l'autre pour former un chélate avec l'ion cuivre. Cette propriété de la β-lactoglobuline n'est pas sans rappeler certaines cuproprotéines enzymatiques appartenant au groupe des oxydases dans lesquelles les imidazoles forment un complexe avec l'ion cuivre.

Aux environs de pH 8 les interactions de l'ion cuivre avec la β-lactoglobuline sont différentes, un nouveau complexe se forme où est impliqué le groupe SH de la protéine. Apparaît alors une bande d'absorption à 375 mμ dont le coefficient d'extinction moléculaire est de 3 000. Ce complexe est une particularité de la β-lactoglobuline. Son spectre présente de grandes ressemblances avec celui des hémocyanines.

La cinétique d'apparition et de disparition de ce complexe chromophore β-lactoglobuline-cuivre est une suite de deux réactions consécutives compétitives du type uni-bimoléculaire. Dans l'étape bimoléculaire l'ion cuivre catalyse une transconformation et une dimérisation de la protéine par formation d'un pont disulfure intermoléculaire.

Nous appelons transition R → S, cette transconformation irréversible provoquée par les ions Cu^{++}, transconformation qui ne peut se produire qu'après la transition $N_2 \rightleftarrows 2R$. La conformation S de la β-lactoglobuline est une structure parfaitement définie dans laquelle le groupe SH et un résidu tryptophane ont été démasqués.

La transition R → S n'est pas spécifique de l'ion cuivre, elle peut être obtenue stoéchiométriquement par 0,5 ion Hg^{++}, soit par un ion Ag^{+} par molécule, soit encore en portant la solution protéique à un pH élevé ou à une haute température, la cinétique de réaction est d'ordre un, le processus est monomoléculaire. Il semble s'agir d'un phénomène de tout-ou-rien, c'est-à-dire d'un système " à déclic " où le groupe SH jouerait un rôle déterminant.

Bien que le processus de transconformation puisse ne pas être le même dans les différents types de " dénaturation " la forme de β-lactoglobuline obtenue, lorsque l'on revient à des conditions standards, est toujours la même. La conformation S est une structure relativement stable de la β-lactoglobuline; sous l'effet de la chaleur ou d'une augmentation de la charge électrique, la molécule se déploie largement mais de façon réversible. Cependant cette lactoglobuline S a tendance à former des agrégats à haute température ce qui n'est pas le cas de la forme R.

L'agrégation thermique de la β-lactoglobuline est le stade ultime d'une série de réactions consécutives de nature différente où le groupe SH, les résidus hydrophobes et les interactions électrostatiques de la protéine jouent un rôle important.

L'agrégation thermique des β-lactoglobulines A et B n'est pas spécifique comme l'est la dimérisation des β-lactoglobulines natives, il y a formation de polymères hybrides stabilisés par la formation de ponts disulfures intermoléculaires.

La β-lactoglobuline, et probablement toutes les protéines globulaires, sont le siège permanent d'un grand nombre d'équilibres de différentes natures; les mieux connus sont sans doute les équilibres multiples d'ionisation responsables des fluctuations de charges à la surface de la protéine. A ceux-ci viennent s'ajouter les équilibres de fixation de ligands dont la nature peut aller de l'ion le plus simple à la macromolécule la plus complexe. Existent enfin les équilibres de transconformation; ce sont des équilibres dynamiques souvent rapides, capables de provoquer des fluctuations de la structure de la protéine dont nous ne saisissons que les effets moyens.

Les fluctuations de structures tertiaires et quaternaires et les fluctuations d'ionisation ou de fixation de ligands ne sont pas indépendantes, elles forment un mécanisme complexe d'interactions réciproques où la moindre modification d'un équilibre particulier peut avoir des répercutions importantes sur la structure générale de la protéine en modifiant l'équilibre des forces en présence.

Ainsi certains groupes ionisables du fait de leur emplacement privilégié, jouent un rôle particulièrement important dans les changements de conformation de la molécule en fonction du pH. Ces groupes présentent nécessairement un pK anormal ; ce sont par exemple dans la β-lactoglobuline : le groupe COOH, le groupe SH et les groupes phénols.

D'autres groupes qui normalement n'ont pas de rôle spécifique dans la structure de la protéine, peuvent en fixant un ligand déplacer les équilibres de transconformation vers une structure jusqu'à lors peu probable : c'est le cas dans la β-lactoglobuline des deux imidazoles qui en chélatant un ion cuivre induisent une transconformation réversible de la molécule.

Enfin il suffit que parmi toutes les conformations possibles que peut présenter une protéine une d'entre elles soit instable et donne lieu à une réaction irréversible, pour que toutes les molécules se transforment irréversiblement avec une vitesse qui est proportionnelle à la probabilité d'existence de la conformation instable dans des conditions données. Si cette conformation instable peut être favorisée par des agents physico-chimiques différents, on conçoit que ces divers agents puissent provoquer la même transconformation irréversible de la protéine.

Bien que du point de vue thermodynamique nous commencions à comprendre le mécanisme des interactions entre les phénomènes de transconformation, de dimérisation et de fixation d'un ligand ou d'un proton, bien que nous connaissions dans certains cas la nature des groupes clefs impliqués dans ces phénomènes, nous ne connaîtrons bien le mécanisme physico-chimique de ces transconformations que lorsque la structure séquentielle de la β-lactoglobuline sera connue, ce qui, nous l'espérons, le sera bientôt. Alors l'étude de la structure tridimensionnelle de cette molécule et de ses changements de conformations fera de rapides progrès.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - Aschaffenburg, R, Drewry, J. (1955). Nature *176*, 218.

2 - Barnard, E.A., Stein, V.D. (1958). Advances in Enzymology. *20*, 52-103.

3 - Bates, R.G., Pinching, G.D., Smith, E.R. (1950). J. Res. Nat. Bur. Stand. *45*, 418.

4 - Beaven, G.H., Holiday, E.R. (1952). Advances in Protein Chem. *7*, 320-382.

5 - Bell, K. (1962). Nature. *195*, 705.

6 - Binon, N., Préaux, G., Lontie, R. (1962). Arch. intern. physiol. biochem. *70*, 291.

7 - Biot, J.B. (1817). Mem. Acad. Sci. *2*, 41.

8 - Blout, E.R., de Lozé, C., Asadourian, A. (1961). J. Am. Chem. Soc. *83*, 1895.

9 - Blout, E.R., Schmier, I., Simmons, N.S. (1962). J. Am. Chem. Soc. *84*, 3193.

10 - Brand, E., Kassell, B. (1942). J. Biol. Chem. *145*, 365-378.

11 - Brand, E., Saidel, K.J., Goldwater, W.H., Kassell, B., et Ryan, F.J. (1945). J. Am. Chem. Soc. *67*, 1524.

12 - Brandts, J.F. (1964). J. Am. Chem. Soc. *86*, 4302.

13 - Briggs, D., Hull, R. (1945). J. Am. Chem. Soc. *67*, 2007-2014.

14 - Bull, H.B., Currie, B.T. (1946). J. Am. Chem. Soc. *68*, 742.

15 - Bull, H.B. (1946). J. Am. Chem. Soc. *68*, 745.

16 - Bunville, L.G. (1959). Thèse L.C. Card, n° MIC. 59. 1668.

17 - Cannan, R.K., Palmer, A.H., Kibrick, A.C. (1942). J. Biol. Chem. *142*, 803.

18 - Cecil, R., Ogston, A.G. (1949). Biochem. J. *44*, 33.

19 - Chien, J. (1948). J. Am. Chem. Soc. *70*, 2256-61.

20 - Christensen, L.K. (1952). Compt. rend. trav. lab. Carlsberg sér. chim. *28*, 37.

21 - Crowfoot, D. (1941). Chem. Revs. *28*, 215.

21 bis - D'Albis, A. (1964). Comptes-Rendus. *259*, 1819.

22 - De Weer, P., Préaux, G., Lontie, R. (1962). Arch. intern. physiol. biochem. 70, 568.

23 - Doran, M.A., Chaberek, S., Martell, A.E. (1964). J. Am. Chem. Soc. *86*, 2129.

24 - Dupont, M. (1962). Compte-Rendu. *254*, 3137.

24 bis - Dupont, M. (Paris, 1964). Thèse de Doctorat.

25 - Drude, P. (1900). "Lehrbuch der Optik" Leipzig. Traduction anglaise Dover, N.Y., 1959.

26 - Edsall, J.T., Felsenfeld, G., Goodman, , Gurd, F.R., (1954). J. Am. Chem. Soc. *76*, 3054-61.

27 - Edsall, J.T., Wyman, J. (1958). Biophysical Chemistry, Acad. Press.

28 - Fernandez-Diez, M.J., Osuga, D.T., Feeney, R.E. (1964). Arch. Biochem. Biophys. *107*, 449.

29 - Foss, J.G. (1961). Biochim. et Biophys. Acta *47*, 569-79.

30 - Fraenkel-Conrat, H. (1954). J. Am. Chem. Soc. *76*, 3606.

31 - Fraenkel-Conrat, H. (1955). Symp. on Structure of Enzyme and Protein. 133.

32 - Franck, H.S., Evans, M.J. (1945). J. Chem. Phys. *13*, 507.

33 - Georges, C., Guinand, S. (1960). J. Chem. Phys. *57*, 606.

34 - Georges, C., Guinand, S., Tonnelat, J. (1962). Bochim. et Biophys. Acta *59*, 737.

35 - Gilbert, G.A. (1959). Proc. Royal. Soc. (London). A. *250*, 377.

36 - Gordon, W.G., Basch, J.J., Kalan, E.B. (1961). J. Biol. Chem. *236*, 2908.

37 - Gough, P., Jenness, R. (1962). J. Dairy. Sci. *45*, 1033.

38 - Gough, P. Jenness, R. (1962). J. Immunol. *89*, 511.

39 - Green, D.W., Aschaffenburg, R. (1959). J. Mol. Biol. *1*, 54-64.

40 - Groves, M.L., Hipp, N.S., Mac Meckins, T.L. (1951). J. Am. Chem. Soc. *73*, 2790.

41 - Guinand, S., Tonnelat, J. (1952). J. Chim. Phys. *49*, 481.

42 - Guinand, S., Georges, C., Pantaloni, D., Tonnelat, J. (1961). Abstr. 1 st. Intern.

43 - Gurd, F.R., Wilcox, P.E. (1956). Advances in Protein Chem. *11*, 311-345-351-357.

44 - Halwer, M., Nutting, G.C., Brice, B.A. (1951). J. Am. Chem. Soc. *73*, 2786.

45 - Herskovits, T.T., Townend, R., Timasheff, S.N. (1964). J. Am. Chem. Soc. *86*. 4445.

46 - Hill, R.M., Briggs, D.R. (1956). J. Am. Chem. Soc. *78*, 1590.

47 - Hughes, W.L. (1947). J. Am. Chem. Soc. *69*, 1837.

48 - Joly, M. (1958). Disc. Faraday Soc. *25*, 150.

49 - Joly, M. (1955). Progress in Biophysics. Biophys. Chem. *5*, 168.

50 - Josien, M.L., Dizabo, P., Laumagne, P. (1957). Bull. soc. chim. France 423.

51 - Kalan, E.B., Greenberg, R. (1961). Arch. Biochem. Biophys. *95*, 279-284.

52 - Kalan, E.B., Gordon, W.G., Basch, J.J., Townend, R. (1962). Arch. Biochem. Biophys. *96*, 376.

53 - Kalan, E.B., Gordon, W.G., Basch, J.J., Townend, R. (1962). Arch. Biochem. Biophys. *96*, 376.

54 - Kalan, E.B., Greenberg, R., Walter, M., Gordon, W.G. (1964). Biochem. Biophys. Research Communs. *16*, 199.

55 - Kauzmann, W., Simpson, R.B., Schellman J. (1953). J. AM. Chem. Soc. *75*, 5154-5139.

56 - Kauzmann, W., (1954). Synp. W. Mac Elroy et B. Glass (ed.), Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland.

56 bis - Kauzmann, W. (1959) dans "Sulfur in Protein Chemisty" p. 93. Academic Press N.Y. and London 1959.

57 - Klotz, I.M., Urquhart, J.M., Fiezs, H.A. (1952). J. Am. Chem. Soc. *74*, 5537.

58 - Klotz, I.M., Urquhart, J.M., Klotz, T.A., Agers, J. (1955). J. Am. Chem. Soc. *77*, 1919.

59 - Klotz, I.M. (1958). Scien. *128*, 815.

60 - Koshland, D.E., Jr. (1959). The Enzyme, Vol. 1., 305, Boyer D., Lardy H., Mÿrbach K., Academic Press, N.Y.

61 - Larson, B., Jenness, R. (1952). J. Am. Chem. Soc. *74*, 3090.

61 bis - Laskowski, M. (1956). Biochim. et Biophys. Acta *581*, 19.

62 - Lengyel, P., Speyer, J.F., Ochoa, S. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. Washington. *47*, 1936.

63 - Leshi, J., Butler, L.G., Gorin, G. (1962). Arch. Biochem. Biophys. *99*, 86-92.

64 - Li, C.H. (1946). J. Am. Chem. Soc. *68*, 2746.

65 - Linderstrøm-Lang, K. (1952). Compt. rend. Trav. lab. Carlsberg sér. chim. *28*, 281.

66 - Linderstrøm-Lang, K. (1958). Symp. on Protein Structure. 23.

67 - Linderstrøm-Lang, K., Nulsen, S.O. (1959). Electrophoresis, Bier (ed.) Academic Press. inc. N.Y. 83.

68 - Lontie, R., Van Goethem, G., De Weer, C., Préaux, G. (1963). Protides of the Biological Fluids, H. Peeters (ed.) Elsevier (1964). Vol. II.

69 - Lontie, R., Buchet, J.P., Préaux, G. (1964). Arch. Int. Physio. Biochim. *LXXII*, 524.

70 - Nemethy, G., Scheraga, H.A. (1962). J. Chem. Phys. *36*, 3382.

71 - Neurath, H., Greenstein, J.P., Putnam, F.W., Erickson, J.O. (1944). Chem. Revs. *34*, 157.

72 - Nirenberg, M.W., Matthei, J.H., Jones, O.W. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. Washington. *48*, 104.

73 - Nozaki, Y., Bunville, L.G., Tanford, C. (1959). J. Am. Chem. Soc. *81-4*, 5523.

74 - Martell, A.E., Calvin, M. (1952). Chemistry of the Chelate Compounds. Prentice-Hall, N.Y.

75 - Mason, S.F. (1963). Quarterly Reviews. *XVII*, 20.

76 - Mc Meekin, T.L., Wilensky, M., Groves, M.L. (1962). Biochem. Biophys. Research Communs. *7*, 151.

77 - Moffitt, W. (1956). J. Chem. Phys. *25*, 467.

78 - Monnot, M. (1963). Thèse de 3ème cycle. Paris.

79 - Monnot, M. (1963). Biochim. et Biophys. Acta *44*, 167.

80 - Monod, J., Changeux, J.P., Jacob, F. (1963). J. Mol. Biol. *6*, 306.

81 - Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. (1965). J. Mol. Biol. *12*, 88.

82 - Ogston, A.G., Cecil, D., (1949). Biochem. J. *44*, 33.

82 bis - Ogston, A.G. (1949). Proc. Roy. Soc. *A 196*, 272.

83 - Palmer, A.H. (1934). J. Biol. Chem. *104*, 359.

84 - Pantaloni, D. (1961). Comptes-Rendus. *252*, 2459.

85 - Pantaloni, D. (1962). Compt. rend. *254*, 1884.

86 - Pantaloni, D. (1962). Compt. rend. *254*, 1884.

87 - Pantaloni, D. (1963). Compt. rend. *256*, 4994.

88 - Pantaloni, D. (1963). Colloque d'information du CNRS. Roscoff. 65.

89 - Pantaloni, D. (1963). Colloque de Biologie Moléculaire, Paris.

90 - Pantaloni, D. (1964). Compt. rend *258*, 5753.

91 - Pantaloni, D. (1964). Compt. rend. *259*, 1775.

92 - Pedersen. K.O. (1936). Biochem. J. *30*, 961.

93 - Pfuderer, A.P. (1961). Thèse, Dissert. abst. U.S.A. *22*, 420.

94 - Piez, K.A., Earl. W., Davie, J., Folk, J.E. (1961). J. Biol. Chem. *236*, 2908.

95 - Polis, D., Schmuckler, H.W., Custer, J.H., Mc Meekin, T.L. (1950). J. Am. Chem. Soc. *72*, 4965.

96 - Préaux, G., Nagant, D., Ramackers, C., Lontie, R. (1964). Arch. Int. Physio. Biochim. *LXXII*, 526.

98 - Roche, J., Dubouloz, P. (1933). Bull. soc. chim. biol. *15*, 954

99 - Rosenbeck, R., Doty, P. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *47*, 1775.

100 - Rosenfeld, V. (1928). Z. Physik. *52*, 161.

101 - Saroff, H.A., Choates, W.L. (1958). Arch. Biochem. Biophys. *74*, 245.

101 bis - Shechter, E., Carver, J.P., Blout, E.R. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. *51*, 1029.

102 - Schellman, J.A. (1955). Compt. rend. trav. lab. Carlsberg sér. chim. *29*, 224.

102 bis - Schellman, J.A. (1958). Compt. rend. trav. lab. Carlsberg sér. chim. *30*, 395.

103 - Schellman, J.A., Schellman, C.G. (1961). J. Polymer. Sci. USA. *49*, 129. 51.

104 - Schellman, J.A., Oriel, . (1962). J. Chem. Phys. *37*, 2114.

105 - Scheraga, H.A., Nemethy, S., Steinberg, L. (1962). *237*, 2506.

106 - Senti, F.R., Warner, R.C. (1948). J. Am. Chem. Soc. *70*, 3318.

107 - Simmons, W.S., Cohen, C., Szent-Gyorgyi, A.G., Wetlaufer, D.B., Blout, E.R. (1961). J. Am. Chem. Soc. *83*, 4766.

108 - Stauff, J., Uhleim, E. (1958). Biochem. Z. *329*, 549.

109 - Stein, W.H., Moore, S. (1949). J. Biol. Chem. *79*, 178.

110 - Susi, H., Zell, T., Timasheff, S. (1959). Arch. Biochem. Biophys. *85*, 437.

111 - Tanford, C., Swanson, . (1957). J. Am. Chem. Soc. *79*, 3297.

112 - Tanford, C., Nozaki, Y. (1959). J. Biol. Chem. *234*, 2874.

113 - Tanford, C., Bunville, L.G., Nozaki, Y. (1959). J. Am. Chem. Soc. *81-3*, 4032.

114 - Tanford, C., De Paristash, K., Taggart, V.G. (1960). J. Am. Chem. Soc. *82*, 6028.

115 - Tanford, C., - (1961), J. Am. Chem. Soc. *83*, 1628.

116 - Tanford, C., Taggart, V.G. (1961). J. Am. Chem. Soc. *83*, 1634.

117 - Tanford, C., De Paristash, K. (1961). J. Biol. Chem. *236*, 1711.

118 - Tanford, C. (1962). J. Am. Chem. Soc. *84*, 1747.

119 - Tanford, C. (1962). J. Am. Chem. Soc. *84*, 4240.

120 - Tanford, C. (1964). J. Am. Chem. Soc. *86*, 2050.

121 - Timasheff, S.N., Townend, R. (1961). J. Am. Chem. Soc. *83*, 470.

121 bis - Timasheff, S.N., Townend, R. (1964). Nature *203*, 517.

122 - Tonnelat, J. (1959). Traité de Biochimie Générale. Jasson, Paris. *1*, 786.

123 - Townend, R., Timasheff, S.N. (1957). J. Am. Chem. Soc. *79*, 3613.

124 - Townend, R., Kiddy, C.A., Timasheff, S.N. (1961). J. Am. Chem. Soc. *83*, 1419.

125 - Treece, J.M., Mc Meekin, T.L. (1963). J. Dairy Sci. *46*, 612.

126 - Uriel, J. (1960). Thèse d'Université, Paris.

127 - Urnes, P., Doty, P. (1961). Advances in Protein Chem. *16*, 401.

128 - Verwey, E.J.W., Overbeek, J. Th. G. (1948). Theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier Publ. N.Y.

129 - Wetlaufer, D.B., Edsall, J.T., Holligworth, B.R. (1958). J. Biol. Chem. *233*, 1421.

130 - Witz, J., Timasheff, S.N., Luzzati, V. (1964). J. Am. Chem. Soc. *86*, 168.

131 - Wurmser, R. (1959). Traité de Biochimie Générale, Masson, Paris *1*, 829.

132 - Wyman, J. (1948). Advances in Protein Chem. *4*, 407.

133 - Wyman, J. (1964). Advances in Protein Chem. *19*, 223.

134 - Yanari, S., Bovey, FA. (1960). J. Biol. Chem. *235*., 2818.

135 - Yang, J.T., Doty, P. (1957). J. Am. Chem. Soc. *79*, 761.

136 - Yon, J., Dupont, M. (1964). Colloque d'information du C.N.R.S. Banyuls. *4*, 76.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Vu et approuvé :
Orsay, le 4 Novembre 1965
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. BERGERARD

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
J. ROCHE

IMP. LATOUR-MAUBOURG
20, rue Augereau - PARIS (7ème)
Dépôt légal n° 104
1er trimestre 1966